BIBLIOTECA MEDICA
DELL'OSPEDALE MAGGIORE DI S. GIOVANNI BATTISTA
E DELLA CITTA' DI TORINO

REALE ACCADEMIA DEI LINCEI
(ANNO CCCXIV 1917)
SERIE QUINTA — VOLUME XII — FASCICOLO IV.

A
491

CONNESSIONI E STRUTTURA DEGLI ELEMENTI NERVOSI
SVILUPPATI
FUORI DELL'ORGANISMO

MEMORIA

DEL PROF.

GIUSEPPE LEVI

(CON 15 TAVOLE)

ROMA
TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI
1917

REALE ACCADEMIA DEI LINCEI
(ANNO CCCXIV 1917)
SERIE QUINTA — VOLUME XII — FASCICOLO IV.

CONNESSIONI E STRUTTURA DEGLI ELEMENTI NERVOSI
SVILUPPATI
FUORI DELL'ORGANISMO

MEMORIA

DEL PROF.
GIUSEPPE LEVI

(CON 15 TAVOLE)

ROMA
TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI
—
PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI
1917

Serie 5ª — *Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.*
Vol. XII, fasc. 5. — *Letta nella seduta del 3 dicembre 1916.*

RELAZIONE

letta dal Socio B. **Grassi**, a nome anche del Corrisp. A. **Ruffini** (relatore), nella seduta del 3 dicembre 1916, sulla Memoria del prof. G. **Levi**, intitolata: *Connessioni e struttura degli elementi nervosi, sviluppati fuori dell'organismo.*

In questo lavoro del prof. Levi vengono descritti una quantità di fatti — in parte nuovi ed in parte meglio ristudiati — riguardanti le proprietà biologiche e strutturali che gli elementi nervosi manifestano nelle colture in vitro. Basta solo di leggere i titoli del sommario e le conclusioni, per vedere con quale successo l'A. abbia saputo affrontare, ed in parte risolvere, le questioni più ardenti sulle proprietà specifiche degli elementi nervosi. Il *potere* e specialmente il *modo* di accrescimento dei neuriti, la loro *proprietà capitale* di formare anastomosi, plessi e reti, *l'intima struttura* degli elementi nervosi ecc., ricevono da questi studii delle spiegazioni molto interessanti fondati fin dove è possibile sulla fisico-chimica.

Noi dobbiamo per ciò salutare con gioia la comparsa di questo lavoro, che è uno dei frutti di numerose indagini che il prof. Levi va da qualche anno perseguendo in questo ed in altri campi e sempre con la medesima tecnica, ideata da Harrison nel 1908.

La Commissione quindi propone che la Memoria presentata dal prof. Levi venga integralmente stampata negli Atti della nostra Accademia.

Connessioni e struttura degli elementi nervosi sviluppati fuori dell'organismo.

Memoria di GIUSEPPE LEVI

presentata nella seduta del 3 dicembre 1916.

(con 15 tavole)

SOMMARIO.

INTRODUZIONE. — 1. Cenni bibliografici. — 2. Accrescimento di neuriti isolati ed indipendenti. — 3. Anastomosi fra rami da uno stesso neurite e fra neuriti distinti. — 4. Neuriti riuniti in cordoni. Formazione di plessi e di reti. — 5. Migrazione di neuroblasti nel plasma. — 6. Intima struttura degli elementi nervosi. — 7. Riassunto. — 8. Indicazioni bibliografiche. — 9. Spiegazione delle Tavole.

INTRODUZIONE.

Noi sappiamo che quasi tutte le cellule differenziate se coltivate fuori dell'organismo perdono dopo qualche tempo i caratteri specifici; soltanto negli elementi nervosi embrionali ed in pochi altri, anche in quelle condizioni tanto diverse dalle fisiologiche, persiste la potenzialità di differenziarsi; però questo non avviene sempre in modo tipico ed i rapporti vicendevoli che si stabiliscono fra gli elementi nervosi nelle colture sono differenti da quelli dell'embrione. Anche per il tessuto nervoso vale adunque la norma, che nella coltura in vitro non si riproduce la struttura che è caratteristica per il tessuto dell'organismo, e se mai ciò avviene imperfettamente.

Però le trasformazioni ed anche i rapporti insoliti degli elementi nervosi nelle colture non sono effetto del caso, ma seguono determinate leggi, che è interessante conoscere, perchè possono contribuire ad illustrare punti controversi sulla struttura del tessuto normale.

Le critiche che da qualche studioso furono rivolte contro il valore del metodo delle colture « in vitro » non mi sembrano molto fondate.

Secondo O. Hertwig (1912) le condizioni nelle quali avviene la differenziazione degli elementi nervosi sono troppo diverse da quelle normali, perchè sia lecito di concludere, che i processi istogenetici siano nell'embrione identici a quelli delle colture. Ed a Held per ragioni analoghe non sembra risulti dimostrato dalle esperienze di Harrison, che le fibre nervose possano svilupparsi senza partecipazione degli elementi cellulari, che le fibre trovano nel loro cammino. Braus (1911) riconosce ai filamenti che crescono nel coagulo il valore di neuriti, cioè di prolungamenti di neuroni, ma mette in dubbio che essi possano essere paragonati a vie nervose.

Obbiezioni analoghe furono rivolte contro altri risultati ottenuti nel dominio della Morfologia sperimentale, ma il tempo ha fatto giustizia di queste critiche e quella disciplina ha proseguito vittoriosamente per la sua via.

Chi vorrà negare ad esempio, che la conoscenza dei processi rigenerativi dei nervi periferici abbia contribuito ad illustrare la genesi delle fibre nervose nell'embrione, nonostante le grandi differenze nel quadro istologico, e sebbene le condizioni nelle quali i due processi si svolgono siano tanto diverse?

Così io ritengo che il metodo di Harrison, col permetterci di dimostrare, che le fibre nervose possono accrescersi in un coagulo, indipendentemente da connessioni protoplasmatiche preesistenti, abbia risolto in modo definitivo questo stesso problema.

Con le ricerche che qui riferisco mi proposi di studiare due ordini di fatti: le connessioni vicendevoli tra gli elementi nervosi embrionali nelle colture, cercando di definire se ed in quanto differiscono da quelle tipiche per il tessuto nervoso; in secondo luogo la struttura intima degli elementi nervosi viventi, tentando di porla in raffronto con quella che si rende manifesta dopo trattamento coi metodi cosidetti elettivi per le neurofibrille.

Col metodo delle colture varie condizioni che impacciano l'analisi delle connessioni fra elementi nervosi sono favorevolmente modificate.

In grazia al limitato spessore del coagulo di plasma nel quale le fibre si sviluppano, queste sono costrette ad estendersi sulla superficie inferiore del vetrino e diventano accessibili all'osservazione in tutta la loro lunghezza. Viene così raggiunto un doppio vantaggio; la dissociazione spontanea di elementi che nel tessuto sono fittamente addensati, e la possibilità di seguire le fibre nervose in tutta la loro estensione, come nelle più sottili membrane, mentre che nel tessuto nervoso siamo costretti a ricostruire faticosamente le strutture decomposte in frammenti dal coltello del microtomo.

Ho preferito per le mie osservazioni il rombencefalo ed il midollo spinale di embrioni di pollo dal terzo al quarto giorno. Anche il lobo ottico di embrioni dal quinto al settimo giorno ed il telencefalo di pulcini sino al dodicesimo giorno si prestano abbastanza bene per lo studio della differenziazione delle fibre in vitro.

Però gli stadî più inoltrati dello sviluppo sono meno adatti per il seguente motivo: avvenendo in essi la differenziazione di un numero sempre crescente di cellule, quanto più progredisce lo sviluppo dell'embrione, il numero delle cellule germinali diviene sempre più scarso, e perciò diminuiscono le probabilità che la differenziazione « in vitro » si produca.

È indispensabile, perchè lo sviluppo delle fibre nervose possa avvenire rigogliosamente, che restino isolati dei frammenti di tessuto nervoso di non più di 0,1 mm. di diametro; invece negli altri tessuti si può avere un accrescimento ricchissimo di cellule mesenchinali da pezzi relativamente voluminosi (sino a 1,5 mm. di diametro ed anche più).

Jngebrigtsen riescì ad ottenere accrescimento di fibre nervose soltanto nel 5 % delle colture di embrioni di 2-3 giorni, perchè la proliferazione connettivale maschera gli elementi nervosi neoformati. Quest' inconveniente esiste realmente, ma non è difficile di evitarlo, liberando gli organi nervosi dai tessuti circostanti; il che si può ottenere con una dissezione accurata sotto il microscopio binoculare, come consiglia Burrows. Ma questa richiede un certo tempo e l'asepsi è spesso compromessa.

Io preferivo per lo più di affidarmi al caso, suddividendo dapprima rapidamente con un paio di forbicine la regione del rombencefalo ed il tronco dell'embrione immersi in liquido di Ringer (¹) in tanti frammenti, che poi trasportavo sui vetrini coprioggetti; con coltellini del Gräfe e con aghi da dissezione suddividevo questi frammenti in pezzettini piccolissimi cercando di maltrattarli il meno possibile. Poi, aspirato con una pipetta sottilissima il liquido di Ringer dal coprioggetti, aggiungevo una piccola goccia di plasma di pollo, preparato in precedenza con le norme ben note; avevo cura di distendere il plasma in uno straterello sottile, e poi capovolgevo il vetrino circondandolo, come di solito, con un orlo di paraffina sul portaoggetti ad incavo.

Il plasma non deve essere abbondante, ma neppure troppo scarso; con coaguli tanto sottili, quali son quelli che io stesso utilizzai per lo studio citologico delle cellule mesenchinali in vitro, non si hanno buoni risultati per il tessuto nervoso; parimenti nel plasma molto diluito le fibre hanno una vitalità troppo limitata; un grado lieve di diluizione è invece, come vedremo, vantaggioso.

Con questa semplice tecnica dei frammenti di rombencefalo e di midollo, e talora anche dei gangli, venivano ben separati dal mesenchina e dai miotomi; in quasi tutte le colture preparate nel modo anzidetto si aveva un accrescimento di fibre, prescindendo naturalmente da quelle inquinate.

Mi riescì talora di preparare così dei pezzetti piccolissimi, di 10-5 cellule ciascuno, e se questi non erano stati maltrattati dagli strumenti, davano origine a neuriti; allora i neuroblasti si disseminavano per la coltura e diventavano direttamente accessibili all'osservazione, condizione, come ognuno comprende, quanto mai favorevole.

I frammenti più grossi di miotomi e di mesenchima venivano allontanati, affinchè il largo alone di elementi mesenchimali, che rapidamente si sviluppa, non ricoprisse gli elementi nervosi.

Le osservazioni sulla coltura vivente venivano come di consueto eseguite mantenendo il microscopio alla temperatura di 39°-40° in un termostato Pfeiffer. Mi servii dell'Apocrom. Imm. Zeiss 3 mm. e di una sorgente luminosa artificiale.

Le fibre nervose incominciano a crescere in qualche caso dopo 5-6 ore, per lo più dopo 12 ore; ma il periodo più adatto per le osservazioni sulla coltura vivente è quello dalle 14 alle 60 ore.

Io ho fatto il possibile per studiare nei preparati fissati le stesse imagini delle quali avevo seguito l'evoluzione nelle colture viventi, ma questo mi riescì soltanto in pochissimi casi. Lo studio delle colture viventi richiede un'osservazione attenta e

---

(¹) Come liquido di lavaggio ho adoperato talora quello di Ringer, altre volte quello di Locke od infine una delle formule consigliate da Lewis, nella quale al glucosio è sostituito il destrosio. Specialmente per le colture del tessuto nervoso è indispensabile che il liquido di lavaggio, del quale naturalmente una certa quantità, per quanto minima, resta nella coltura e si mescola al plasma, sia preparato con grande precisione.

paziente, e per ciascuna esperienza soltanto due o tre colture, dato il periodo di vita limitato del tessuto nervoso, possono essere studiate a lungo viventi. D'altra parte la riescita delle colorazioni specifiche è quanto mai incerta, tanto che, su molte centinaia di colture ben riescite di tessuto nervoso, in non più di 60 ottenni una colorazione soddisfacente; sia perchè il coagulo si distaccava, sia perchè quest'ultimo era troppo spesso e gli elementi nervosi rimanevano mascherati, sia perchè la colorazione specifica non riesciva per cause imprecisabili; e ciò valga specialmente per quella di Cajal.

Ma quando il metodo fotografico riesce positivo dà risultati eccellenti sulle colture « in toto »; per evitare la formazione di precipitati nel plasma proteggevo la coltura, dopo fissazione in alcool, con un sottile straterello di celloidina, la quale veniva disciolta dopo la riduzione; poi la coltura veniva virata col cloruro d'oro e resa più trasparente col metodo Veratti. Ciononostante il plasma rimane colorito intensamente in violetto e le neurofibrille non sempre risaltano abbastanza, almeno a luce ordinaria; ma eseguendo le osservazioni con una sorgente luminosa molto intensa, anche i punti meno trasparenti del preparato diventano utilizzabili.

Anche coll'ematossilina molibdica di Held, dopo fissazione in liquido di Zenker (formula con 3 % di acido acetico) oppure in liquido di Maximow (formula con aggiunta di tetrossido di osmio) si raggiunge una colorazione delle neurofibrille; la fissazione non deve essere protratta al di là di qualche minuto e lo stesso valga per la fissazione in alcool richiesta dal metodo Cajal. Le colture prima di venire fissate venivano lavate in liquido di Ringer.

Per la riproduzione delle figure sarebbe stato preferibile di ritrarre un maggior numero di imagini da colture viventi di quanto non sia stato fatto; ma non è sempre possibile di riprodurre delle figure complesse ed a forti ingrandimenti da colture viventi, coll'apparecchio da disegno.

Perciò sono stato costretto a documentare la mia descrizione con imagini tolte prevalentemente da preparati fissati; del resto la concordanza fra le une e le altre è perfetta..

I.

Cenni bibliografici.

Le ricerche di Harrison, di Burrows, di W. ed M. Lewis, di Ingebritsen, sebbene eseguite su materiale diverso, concordano nei punti essenziali: i cilindrassi crescono in lunghezza e si dividono nel mezzo di coltura: e ciò avviene per movimento ameboide dell'estremità della fibra; quest'ultima è ispessita e brevi filamenti vengono emessi e poi retratti, poi nuovi filamenti appaiono in altri punti dell'ispessimento terminale. Harrison (1909), al quale, come tutti sanno, dobbiamo la scoperta di fatti tanto interessanti, ha paragonato questa varietà di movimento dell'estremità della fibra a quello notissimo che caratterizza la locomozione di un leucocita o di un'ameba; una piccola massa di sostanza attiva parte dal neuroblasta e progredendo stira il protoplasma in un filamento, la fibra nervosa.

È doveroso riferire, che molti anni prima Cajal aveva affermato, che le fibre nervose dell'embrione crescono per movimento ameboide, fondandosi sull'aspetto particolare delle cosiddette mazze terminali, le quali erano state messe in evidenza da quest'A. all'estremità dei cilindrassi in via di accrescimento. Harrison potè fornire la dimostrazione sicura di quanto Cajal aveva supposto.

Dei rapporti vicendevoli fra elementi nervosi, Harrison e Burrows (1911) si occupano soltanto incidentalmente. Nelle colture di embrioni di rana illustrate da Burrows le fibre crescevano separate, ed anche se riunite in fascetti, le singole fibre rimanevano ben individualizzate; in qualche caso furono osservate delle anastomosi fra le fibre, ma queste erano transitorie.

Da una figura di Burrows si rileva, che nelle colture di embrioni di pollo le fibre decorrono per un certo tratto riunite in cordoni, per poi divergere; l'A. fa anche cenno di anastomosi fra i rami di divisione delle fibre.

W. ed M. Lewis (1912) hanno approfondito alquanto lo studio delle connessioni fra fibre nervose; dapprima le fibre provenienti da frammenti di intestino di embrioni di pollo, coltivate in mezzi liquidi inorganici, crescono isolate o riunite in gruppi; ma già dopo 10 ore sono emessi, per attività ameboide del neurite, dei filamenti lunghi e delicatissimi, in numero sempre crescente, che possono saldarsi ad altre fibre; si stabiliscono così delle anastomosi fra cilindrassi, alcune delle quali sono transitorie, altre permanenti; per questa via si arriva alla formazione di estese reti di sottili fibre nervose.

Gli AA. descrivono e raffigurano dei nervi ramificati ed anastomizzati a plesso, alla costituzione dei quali partecipano molte sottilissime fibre, e queste rappresentano i prolungamenti di varî neuroblasti.

Ingebritsen (1913) coltivò a preferenza frammenti di corteccia cerebrale di embrione di pollo dal 6° al 18° giorno, ed anche dei pezzetti di cervelletto, di midollo e di gangli di giovani mammiferi dal 2° al 7° mese, e potè sorprendere l'accrescimento di fibre isolate, talora molto lunghe e ramificate; dopo 48 ore fu notato anche un aumento in spessore delle singole fibre; è frequente la presenza di nodosità sul tragitto delle fibre.

Io farei invero qualche riserva sul significato da attribuire alle colture di tessuto nervoso altamente differenziato, qual'è quello dei giovani mammiferi al 7° mese. E dimostrato, almeno per il midollo e per i gangli dei mammiferi, che tutte le cellule germinali si differenziano in neuroblasti molto prima della nascita. Perciò le fibre che crescevano nel plasma nelle colture di mammiferi illustrate da quell'A. non potevano provenire da neuroblasti differenziati nella coltura, come nelle colture di embrioni precoci; probabilmente si tratta di fibre preesistenti nel tessuto, che per effetto dell'esplantazione furono mutilate e si sono rigenerate nella coltura.

La possibilità di una rigenerazione delle fibre in vitro è del resto dimostrata dallo stesso autore con una bella esperienza; recidendo un gruppo di fibre che erano cresciute nel plasma, le fibre separate dal centro trofico degenerano dopo 20 ore e presso a poco allo stesso periodo nuove fibre germogliano dai monconi centrali delle fibre recise.

Cajal (1910), Legendre e Minot (1910, 1911), Marinesco e Minea (1912) hanno illustrato le modificazioni che avvengono nei gangli spinali di animali giovani od adulti, conservati fuori dell'organismo, in siero di sangue od in liquido cefalo-rachidiano.

Cajal ha notato la differenziazione di grossi lobi dal corpo cellulare e dal tratto iniziale del neurite. Legendre e Minot nei gangli di cane adulto conservati in siero di sangue videro delle trasformazioni nella costituzione della cellula gangliare, le quali hanno evidentemente il valore di fenomeni regressivi ed in più la neoformazione di numerose fibre che si avvolgono intorno alla cellula in plessi pericellulari. Anche Marinesco e Minea descrivono una rigogliosa neoformazione di fibre, le quali si spingono dal ganglio nel plasma.

Io stesso iniziai alcuni anni or sono delle esplantazioni di gangli col metodo seguìto da quegli autori e dalle osservazioni allora eseguite ritrassi la convinzione, che in quelle condizioni le cellule gangliari sopravvivono per un periodo limitato; e la descrizione stessa di Legendre e Minot lascia il dubbio, che una parte almeno dei fatti osservati non abbia il valore di fenomeni vitali.

Ad ogni modo essi nulla hanno di comune con quelli che si svolgono nella coltivazione del tessuto nervoso embrionale, la quale richiede accorgimenti tecnici ben diversi da quelli seguiti da quegli autori.

Sanguineti (1914) studiò l'azione di sostanze nervine sull'accrescimento di tronchi nervosi di cavia giovane coltivati in vitro, e constatò cellule giovani in moltiplicazione orientate in senso radiale « l'aspetto del tessuto sembra connettivale e non è molto chiara la partecipazione dell'elemento nervoso »(!!).

L'A. evidentemente non si rende conto della poca verosimiglianza di una neoformazione di fibre nervose da un tronco di nervo separato dai centri.

Dalle ricerche riferite risulterebbe, che il tipo di accrescimento delle fibre del simpatico ha caratteristiche diverse da quello delle fibre cerebro-spinali; le prime crescerebbero spesso a fascetti e formerebbero dei plessi (Lewis), quelle provenienti dal midollo spinale crescerebbero prevalentemente isolate (Harrison, Ingebritsen).

Ma io trovai in moltissime delle mie colture di organi nervosi centrali delle strutture simili a quelle descritte da W. e M. Lewis ed altre più complicate, accanto a fibre isolate ed a reticoli di finissime fibre. D'altro canto ottenni alcune colture, nelle quali tutte le fibre o quasi rimangono durante la loro breve vita indipendenti.

Le condizioni che fanno prevalere l'una o l'altra modalità di accrescimento degli elementi nervosi poterono essere definite soltanto approssimativamente. Certamente le fibre non crescono isolate se il coagulo di plasma è poco denso e se non ha uno spessore rilevante, mentre le fibre riunite a fasci od anastomizzate a plesso crescono piuttosto nelle colture di frammenti piccolissimi e con coagulo sottile e più lasso, perchè lievemente diluito con una piccola quantità di liquido di Ringer.

Ma è prevedibile che anche altri fattori abbiano influenza sui caratteri della coltura ed uno dei più importanti dovrebbe essere, quale varietà di elementi nervosi del pezzo esplantato ha sopravissuto e si è differenziato.

Quest'è appunto uno dei maggiori inconvenienti nella coltivazione del tessuto nervoso, di essere costretti ad operare alla cieca, senza poter definire la natura degli elementi nervosi da cui provengono le fibre; a questo risultato potremo arrivare soltanto quando avremo trovato il mezzo di isolare i varî centri senza comprometterne l'integrità. Riferendoci al midollo spinale, è per lo meno verosimile che le fibre abbiano nella coltura una disposizione differente a seconda che provengono da cellule radicolari o da cellule dei cordoni o da altri elementi ancora.

In qualche caso, è vero, i neuroblasti abbandonano il tessuto ed emigrano per breve tratto nel plasma, analogamente a quanto Harrison ha visto nella rana; ma nelle fasi precoci in cui io sperimentavo, i neuroblasti non hanno caratteri specifici tali da permetterci di stabilire a quali regioni del midollo o del rombencefalo essi appartengono. Se adunque in quest'ordine di ricerche vi sono ancora molte lacune, esse dipendono da imperfezione del metodo.

Per facilitare la mia descrizione, cercherò di raggruppare in tipi le varietà che l'accrescimento degli elementi nervosi nelle colture presenta, risalendo dai fatti più semplici e meglio noti a quelli più complessi; sebbene riesca un po' artificioso il separare gli uni dagli altri, dato che in una stessa coltura troviamo molte varietà di rapporti e di connessioni, ed anche perchè i varî tipi sono collegati fra loro da forme di transizione.

II.

Accrescimento di neuriti isolati ed indipendenti.

È la varietà di accrescimento delle fibre che fu illustrata da Harrison per la rana, da Burrows e da Ingebritsen per il pollo. In alcune colture, come ho poco fa accennato, tutte le fibre sembrano indipendenti; questo ho notato con grande costanza in colture di lobo ottico di embrione di pollo al settimo giorno, se lo spessore del coagulo era rilevante, e se il reticolo di fibrina era denso. In una coltura di questo tipo già alla fine del primo giorno numerosissime fibre sottili invadono il coagulo, ed al secondo giorno esso è attraversato da un intreccio straordinariamente fitto di fibre, le quali emergono isolate dal tessuto; sono lunghe, in parte ramificate (fig. 1) e si sovrappongono in molti piani. Alla loro emergenza del tessuto sono ravvicinate, ma divergono subito non appena hanno raggiunto il coagulo di plasma.

Di solito le fibre non possono essere seguite sino all'origine dalle cellule rispettive, perchè il frammento esplantato è troppo opaco; quando però qualche neuroblasta emigra nel plasma (fig. 1) si scorge la continuità fra la fibra e l'estremità conica della cellula. Qualche neuroblasta dava origine a due, e perfino a tre lunghe fibre.

L'accrescimento delle singole fibre può agevolmente essere studiato in qualsiasi coltura vivente, purchè l'attenzione dell'osservatore si fissi per qualche tempo sulla estremità libera di un neurite.

Le grosse fibre degli embrioni di rana, l'accrescimento delle quali fu tanto lucidamente descritto da Harrison, si espandono in una massa tozza ed irregolare e da essa si sollevano delle brevi spine a forma triangolare; e l'accrescimento della fibra avviene per lo spostamento di questa massa in direzione distale.

Nelle fibre di embrione di pollo studiate da Burrows l'ispessimento terminale non è molto diverso da quello delle fibre di rana, ma i prolungamenti ameboidi sono più lunghi. Nelle fibre del simpatico (W. e M. Lewis) invece la fibra si dissocia in un pennello di lunghissimi filamenti.

Io mi son convinto che tali diversità non hanno alcun valore di specificità, poichè si ritrovano nelle varie fibre di una stessa coltura e si succedono perfino in una stessa fibra.

Il fatto essenziale è che all'espansione terminale spetta sempre la funzione dell'accrescimento in lunghezza della fibra e che questo non può compiersi con altro mezzo; non appena le fibre emergono dal margine del pezzo, emettono quei delicati filuzzi (fig. *A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*); e d'altra parte la scomparsa dell'espansione è un segno certo dell'arresto nell'accrescimento; se l'attività della fibra si ridesta, i filuzzi vengono riemessi, se invece il suo arresto è definitivo, i filuzzi più non ricompaiono, la fibra prende un aspetto varicoso e degenera.

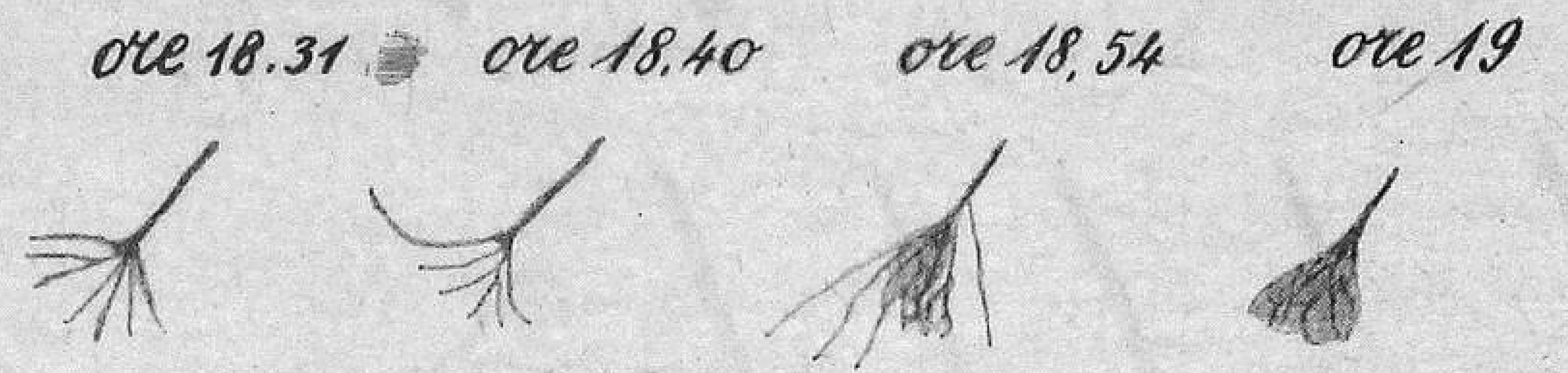


Fig. *A*. — Da una coltura vivente di lobo ottico di un embrione al 7° giorno, alla 30ª ora. Modificazioni dell'espansione terminale di una fibra (temp. 39°).

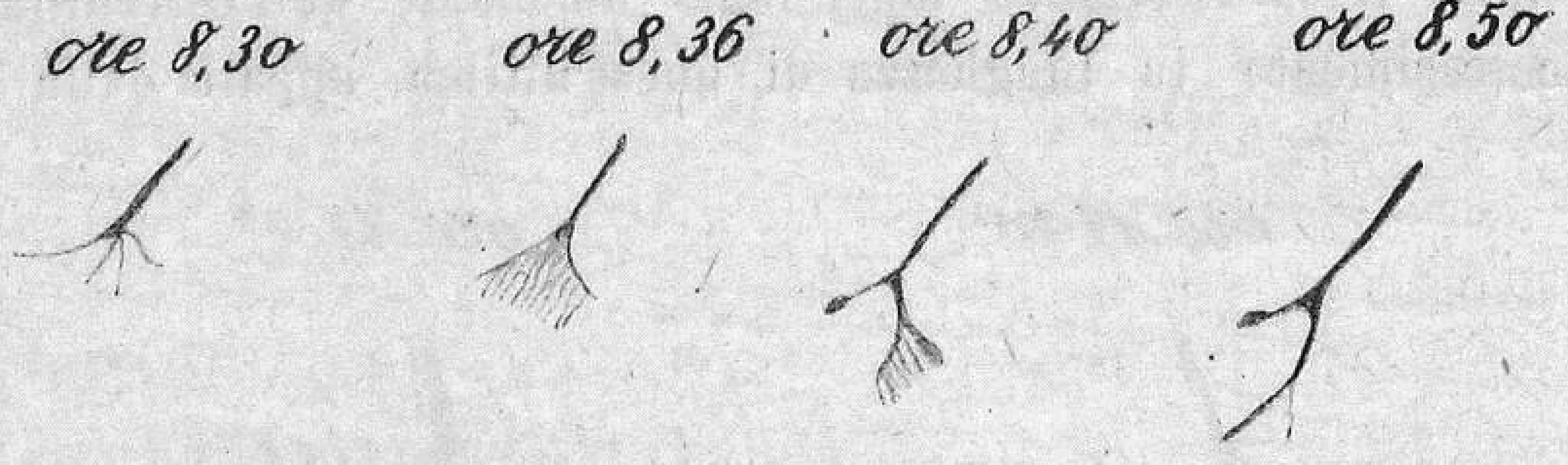


Fig. *B*. — Dalla stessa coltura della fig. *A* alla 43ª ora. Modificazioni dell'espansione terminale di una fibra (temp. 39°).

Le fibre più grosse terminano con un bottone, dal quale parte un gruppetto di filamenti divergenti (fig. *D*), nelle più sottili un ispessimento manca od è appena apprezzabile e la fibra sembra dissociarsi direttamente in filamenti (figg. *A* e *B*). Spesso l'espansione ripete la forma di una mano colle dita divaricate (fig. *S*).

Ma non di rado le forme a ciuffetto si alternano con quelle a rigonfiamento sferico o clavato (fig. *C*); i filamenti si retraggono e la sostanza di questi va ad ingrossare l'estremità della fibra; oppure la fibra si rigonfia in un globetto protoplasmatico, il quale si sfiocca in 2-3 esili filamenti.

Talora i filamenti terminali sono indipendenti, ma possono anche essere uniti da fugaci anastomosi (fig. *R* in *B*); oppure dei filamenti dapprima ben individualizzati si confondono in una matassa od in una rete intricata (fig, *A*), la quale dopo qualche tempo può anche confluire in una massa protoplasmatica omogenea; quest'ultima emette dei prolungamenti ameboidi, a forma di piccole digitazioni, non di filamenti; ma dopo qualche tempo la fibra si espande nuovamente in un ciuffo, forma che probabilmente è la più favorevole all'accrescimento in lunghezza della fibra.

Anche in colture fissate ho visto talora i filamenti dell'espansione, coloriti elettivamente col metodo fotografico, anastomizzati a reticolo (fig. 27, *b*); ma credo si tratti di disposizioni transitorie e quei filamenti sono quasi certamente destinati a divenir liberi (come nella fibra *c* della fig. 27).

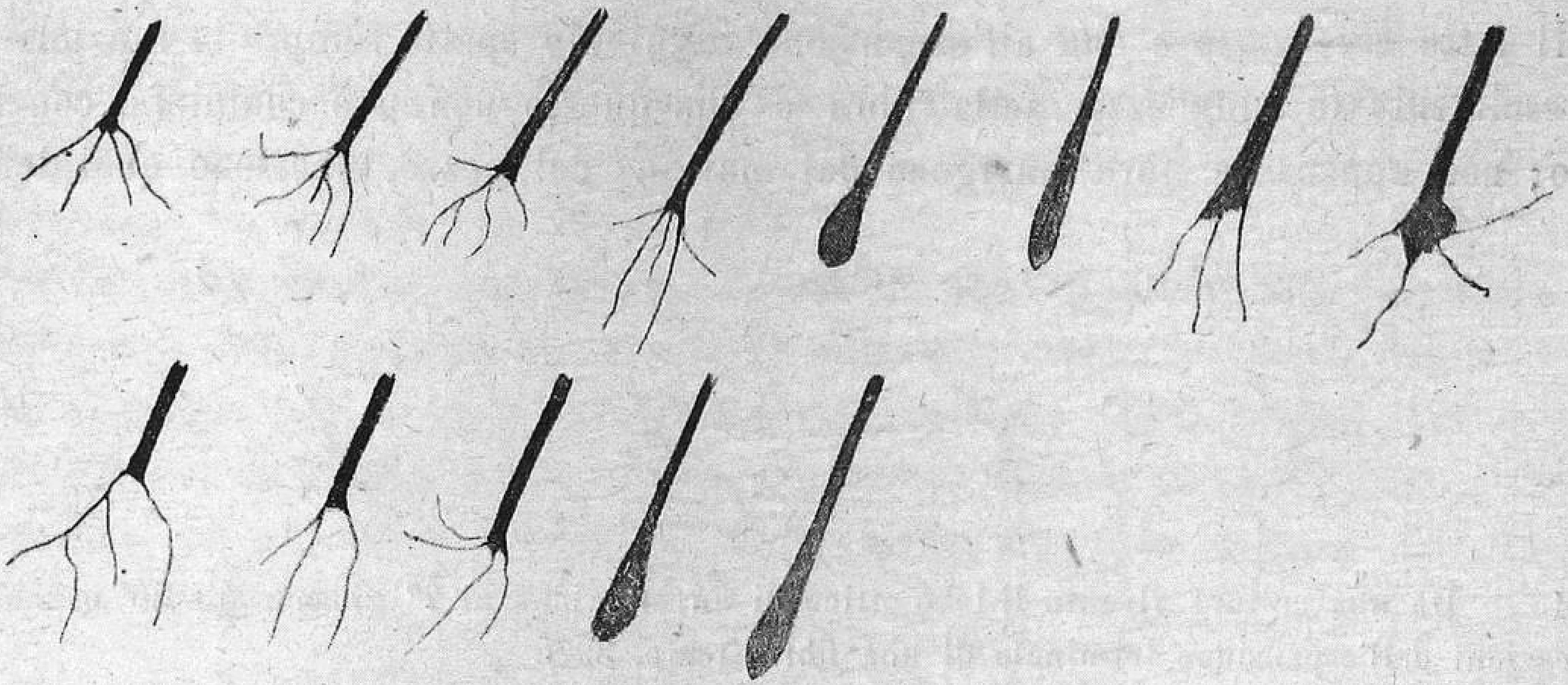


Fig. *C.* — Da una coltura vivente di 24 ore di lobo ottico di embrione al 7° giorno (esper. 15). Modificazioni dell'espansione di una grossa fibra ad intervalli di 3 minuti.

In qual modo il caratteristico movimento ameboide dell'estremità della fibra conduca all'accrescimento in lunghezza di quest'ultima, appare dalla fig. *F*. In *a* vediamo uno dei consueti mazzetti terminali; in *b* tre soli filamenti sono rimasti, gli altri furono riassimilati, e dei tre uno è cresciuto ed ha emesso dei brevi rami collaterali a barbe di penna; dopo 10 minuti quest'ultimo filamento si è ispessito e rappresenta la continuazione della fibra principale; dei suoi rami collaterali uno solo è rimasto, si è diviso ed emette a sua volta delicati filamenti collaterali.

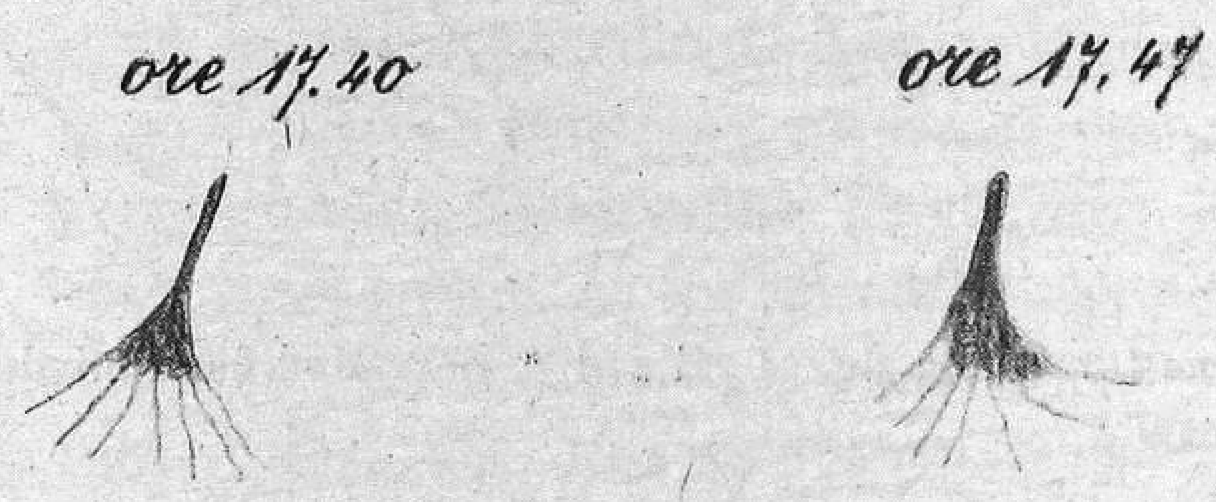


Fig. *D.* — Da una coltura vivente di 8 ore della corteccia di pulcino al 12° giorno (esper. VI). Modificazioni nell'espansione di una grossa fibra.

La grossa fibra riprodotta nella fig. *G* si espandeva in lunghi filamenti; tale fibra che è ancora brevissima, ha una lunghezza di 12 μ, si divide in tronchi tozzi e brevi, i quali si sfioccano in ramuscoli, che si assottigliano progressivamente verso l'estremità e sono uniti da rami anastomotici. Anche nelle colture viventi si distinguono talora queste lunghe fibrille, ma poichè esse si continuano in filamenti di fibrina è difficile di definire ove cessi la sostanza nervosa e dove cominci il filamento di fibrina.

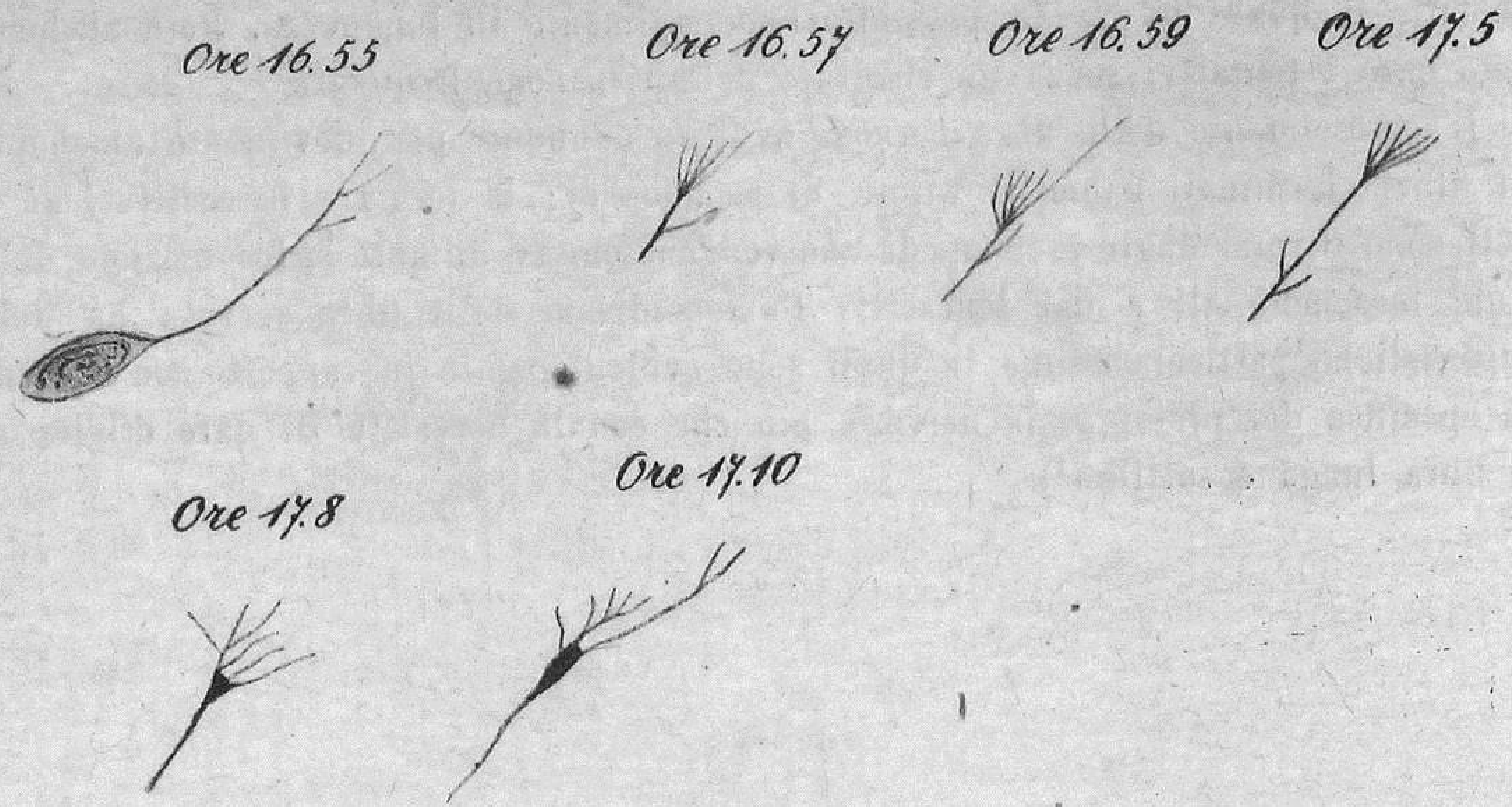


Fig. *E.* — Da una coltura vivente di 6 ore di corteccia cerebrale di embrione di 6 giorni e mezzo (esper. 19). Neuroblasta con breve neurite; furono studiate le trasformazioni dell'espansione del neurite.

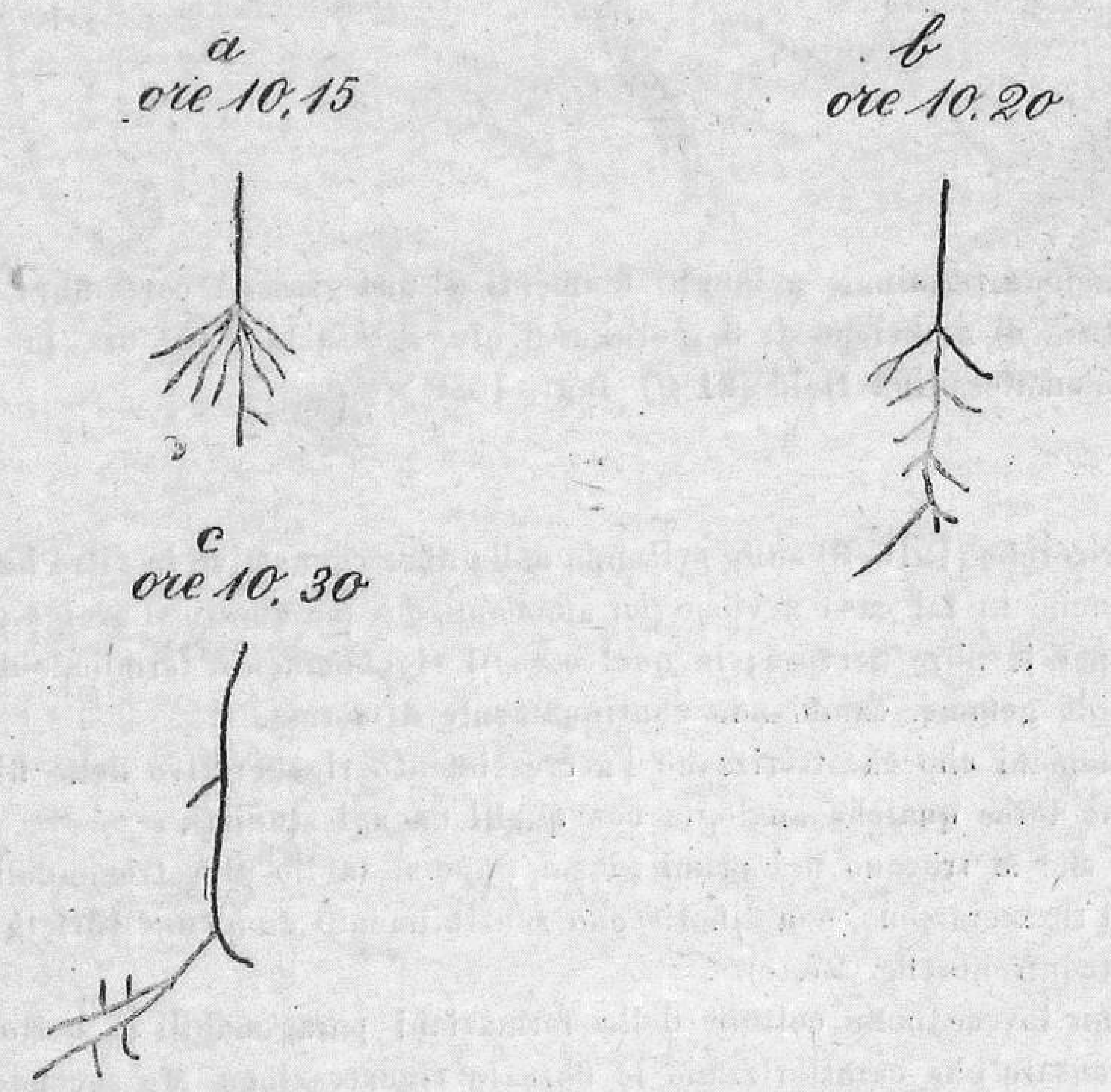


Fig. *F.* — Da una coltura vivente di 19 ore di un embrione di 3 giorni e 6 ore (esper. 12). Modificazioni di una fibra durante il suo accrescimento in lunghezza.

Potrà sembrare strano che questi lunghi filamenti siano transitorî, ma così è realmente; fra tutti uno solo è destinato ad ispessirsi e diventa la continuazione della fibra; esso emette nuovi filamenti e così via di seguito.

La biforcazione di una fibra avviene quando due filamenti di un fiocchetto terminale hanno contemporaneamente la prevalenza sugli altri, e persistono a lungo; finiscono col divenire due fibre definitive quando ciascuno di essi emette un ciuffo di filamenti, il quale ne rende possibile l'accrescimento in lunghezza. Però anche in questo caso i tentativi senza un risultato definitivo sono frequenti.

L'accrescimento delle fibre nervose avviene adunque per movimento ameboide, ed i filuzzi terminali hanno il valore di pseudopodi; la forma e la costituzione di questi sono diversi dagli pseudopodi che vengono emessi durante la locomozione delle cellule mesenchimali e dei leucociti; l'ameboidismo della fibra nervosa ha delle caratteristiche particolarissime, le quali sono evidentemente in rapporto con la struttura specifica del protoplasma nervoso, più che con la necessità di dare origine ad una fibra lunga e sottile (¹).

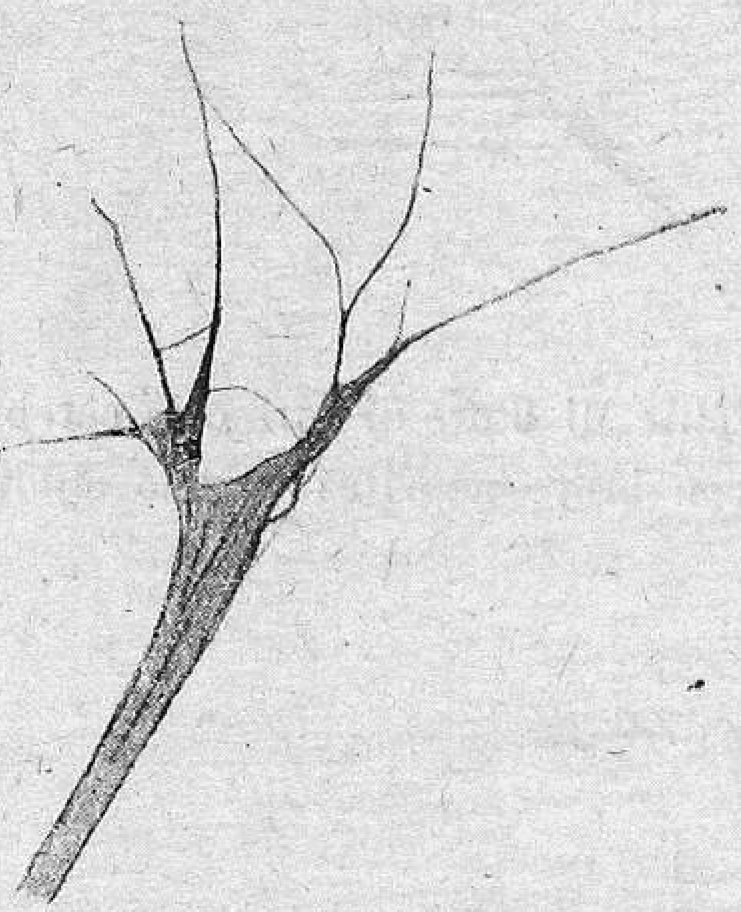


Fig. *G.* — Espansione terminale a lunghi filamenti di una grossa e corta fibra (12 μ di lunghezza). Da una coltura di embrione di 3 giorni e 6 ore, fissata alla 45ª ora in liquido Maximow e colorita coll'ematossilina Held (21 *Q*). Ingr. 1650 ×

(¹) Le mie ricerche (1916, 3) sullo sviluppo delle fibre connettive in vitro hanno dimostrato, che l'accrescimento anche in tal caso avviene per ameboidismo, ma questo si svolge con modalità diverse da quello tipico per le fibre nervose; in quel caso il rigonfiamento terminale della fibra connettiva emette delle piccole gemme, cambiando continuamente di forma.

Invece i fenomeni che caratterizzano l'accrescimento rigenerativo delle fibre nervose dell'animale adulto hanno forse qualche analogia con quelli da noi studiati.

I fiocchetti che si trovano nei primi giorni dopo il taglio all'estremo delle fibre del moncone centrale in via di rigenerazione, non differiscono sensibilmente da alcune varietà di espansioni delle fibre embrionali (confronta fig. 27, *c*).

Non troviamo invece nelle colture delle formazioni paragonabili ai bottoni a fibrille straordinariamente addensate che caratterizzano le fibre in rigenerazione. Ma secondo Perroncito (1908) questi bottoni non potrebbero essere paragonati ai coni di accrescimento, ma rappresenterebbero degli episodî del meccanismo di avanzata delle giovani fibre.

Che anche la rigenerazione delle fibre sia legata a fenomeni di ameboidismo sembra certo, ed anche Perroncito l'ha affermato. E confrontando le figure *f* della monografia di quest'autore con quanto si osserva nella coltura vivente, si acquista la convinzione che i finissimi filamenti, i quali partono dai bottoni corrispondano ai filamenti ameboidi, che vengono emessi e poi retratti dalle espansioni delle fibre cresciute in vitro.

L'emissione di pseudopodi è un tentativo da parte della fibra nervosa per trovare la via più favorevole al suo accrescimento; quando questa via è trovata, quello pseudopodo che offre maggiori garanzie di stabilità riceve una più cospicua quantità di protoplasma dalla fibra principale, e perciò si ingrossa e diventa la continuazione della fibra, e contemporaneamente la zona di maggiore attività si sposta verso l'estremo distale.

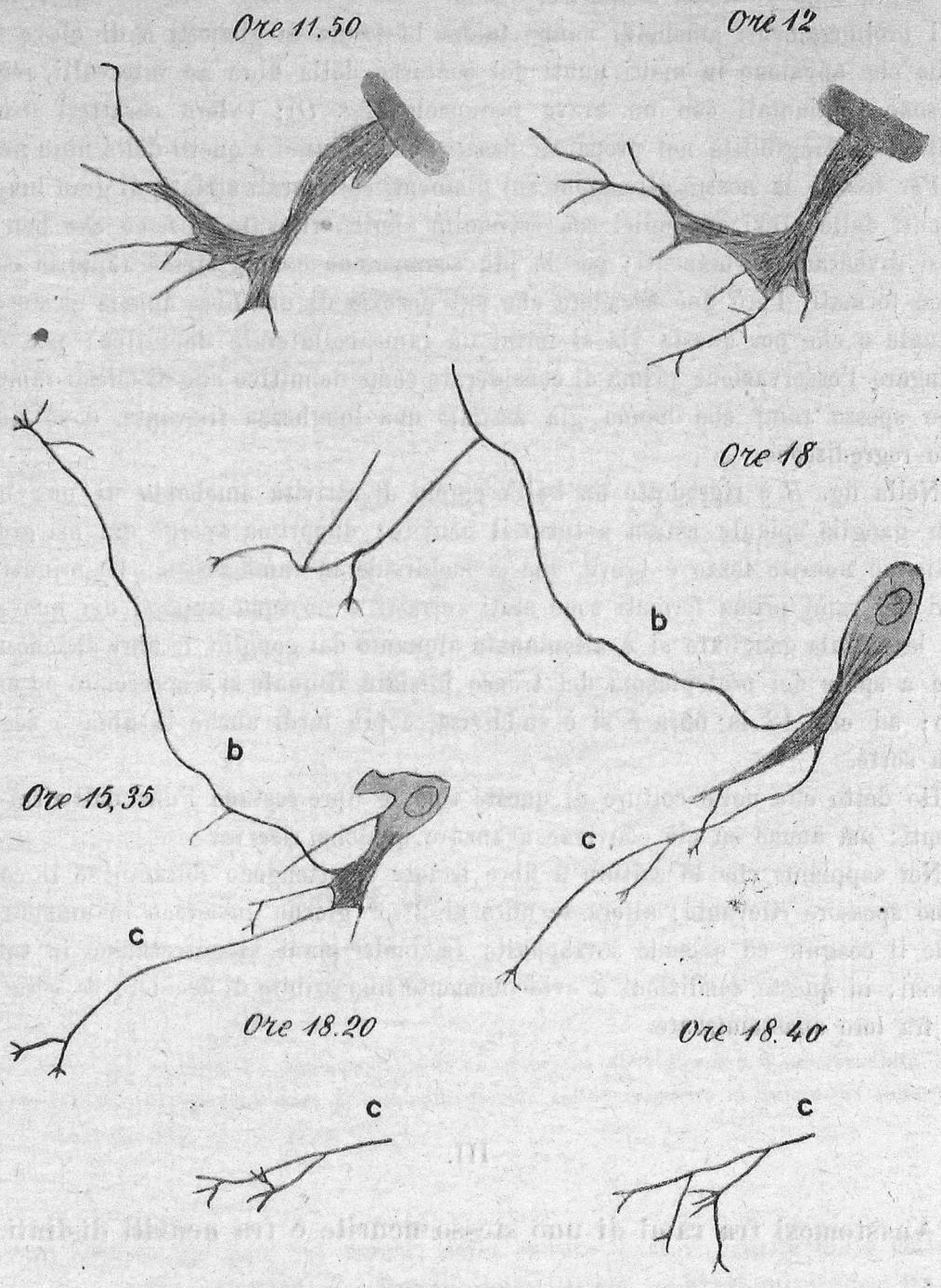


Fig. *H.* — Da una coltura di 19 ore di un ganglio spinale di un embrione di 3 giorni e 6 ore (11 *A*). Fu seguito l'accrescimento di un grosso cilindrasse di una cellula del ganglio e la migrazione di quest'ultima nel plasma (temp. 39°).

Sarebbe però inesatto il voler limitare l'attività della fibra soltanto alla sua estremità distale; dalle osservazioni di W. ed M. Lewis e dalle mie risulta, che da tutta la fibra, anche nel suo tratto più prossimale vengono emessi dei filuzzi, dei quali i più sono destinati a sparire.

I prolungamenti ameboidi hanno talora la forma di globetti o di clave piccolissime che appaiono in molti punti del contorno della fibra ad intervalli regolari; essi sono impiantati con un breve peduncolo (fig. *O*); i loro caratteri fisici nel vivente e la tingibilità nei preparati fissati sono identici a quelli della fibra nervosa.

Per fissare la nostra attenzione sui filamenti collaterali affilati, di gran lunga più frequenti delle brevi appendici con estremità sferica rilevata, diremo che ben pochi di essi diventano permanenti; per lo più scompaiono con la stessa rapidità con cui si sono formati. Però può accadere che sul decorso di una fibra appaia un' fiocchetto terminale e che per questa via si formi un ramo collaterale definitivo; ma occorre prolungare l'osservazione prima di considerare come definitivo uno di questi ramuscoli, perchè spesso rami che hanno già assunto una lunghezza rilevante, dopo qualche tempo regrediscono.

Nella fig. *H* è riprodotto un bell'esempio di attività ameboide di una cellula di un ganglio spinale estesa a tutto il neurite; dapprima sporge dal margine del ganglio un neurite tozzo e breve, che si suddivide in rami sottili; 10 minuti dopo alcuni dei rami prima formati sono stati retratti e ne sono apparsi dei nuovi; più tardi la cellula gangliare si è allontanata alquanto dal ganglio, le fibre si sono accresciute a spese del protoplasma del tronco iniziale, il quale si è accorciato ed assottigliato; ad ore 18 la fibra *b* si è suddivisa, e più tardi anche la fibra *a* segue la stessa sorte.

Ho detto che nelle colture di queste tipo le fibre restano l'una dall'altra indipendenti; ma anche su ciò conviene avanzare qualche riserva.

Noi sappiamo che le colture a fibre isolate si ottengono soltanto se il coagulo ha uno spessore rilevante; allora le fibre al 2°-3° giorno invadono in numero stragrande il coagulo ed essendo sovrapposte in molti piani si intrecciano in tutte le direzioni; in queste condizioni è evidentemente impossibile di decidere se esse siano o no fra loro anastomizzate.

III.

Anastomosi fra rami di uno stesso neurite e fra neuriti distinti.

Le anastomosi sono frequenti in tutte le colture a coagulo sottile, ma naturalmente sono più adatte allo studio quelle non troppo ricche di fibre. La varietà più semplice di anastomosi si osserva quando due rami di divisione di un neurite si ricongiungono in un'unica fibra. Quando il neurite si divide in molti rami e questi vengono poi riuniti da fibre anastomotiche, si viene a formare una vera rete a larghe maglie, la quale non di rado si ricostituisce più oltre in una fibra unica; oppure dalla rete si staccano alcune fibre, ciascuna delle quali termina liberamente con un'espansione (figg. 2, 3).

Le figg. 2 e 3 riescono particolarmente dimostrative, perchè la rete è costituita da fibre, delle quali si può rintracciare l'origine, essendo avvenuta in quella coltura una migrazione di qualche neuroblasta nel plasma.

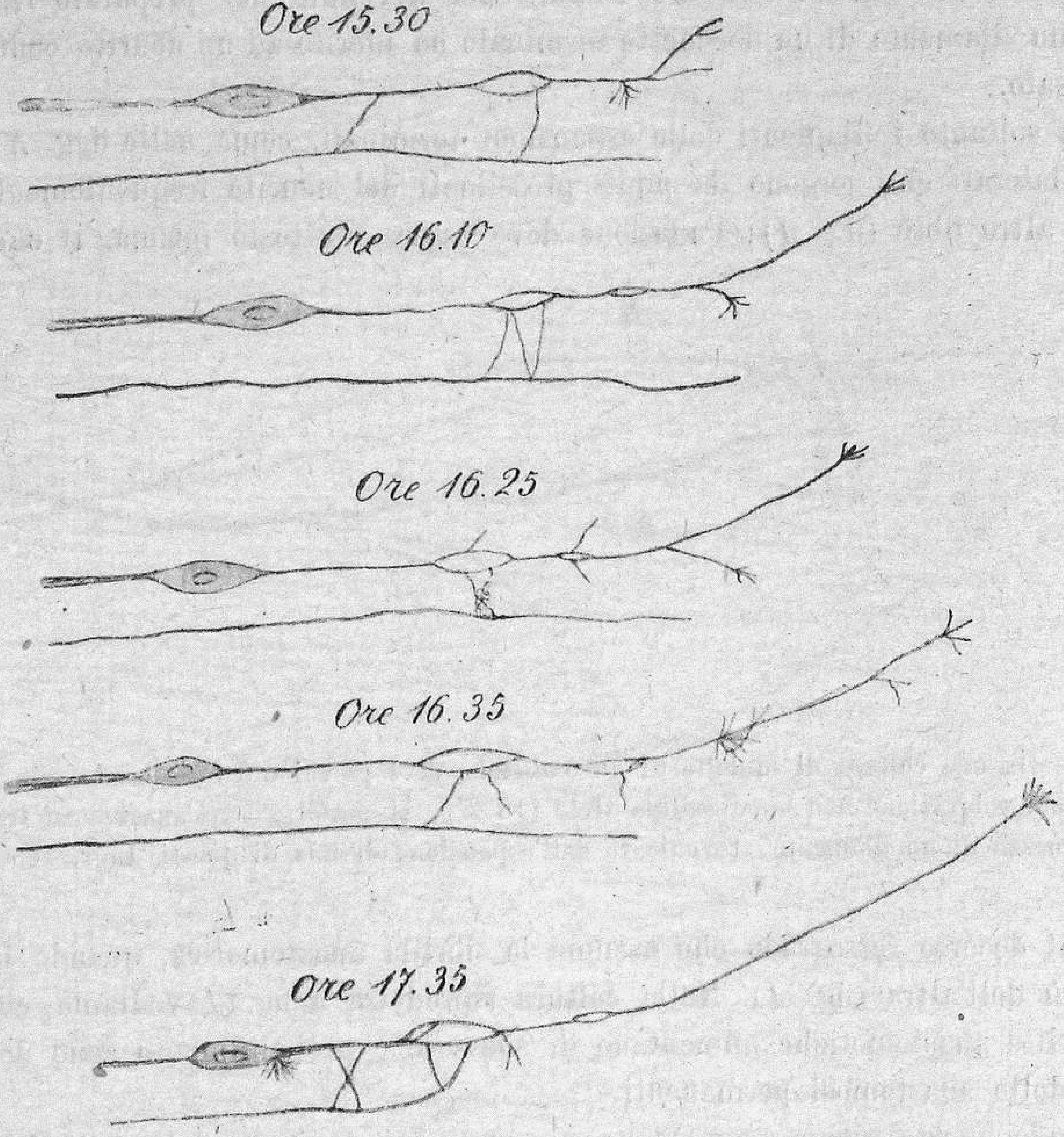


Fig. *J.* — Da una coltura di rombencefalo di un embrione di 3 giorni e 6 ore, studiata vivente alla 21ª ora (21 *A*). Una fibra proveniente da una cellula bipolare si unisce per mezzo di numerose anastomosi ad una fibra vicina.

Nella fig. 2 fra uno dei neuriti della cellula *a* ed il neurite della cellula *b* avviene uno scambio di fibre ed i neuriti della cellula *a*, anastomizzandosi fra loro, costituiscono una vasta rete. Nella fig. 3 della stessa coltura ha luogo un'anastomosi fra due neuriti in *A*, e più oltre gli stessi formano una rete che non fu disegnata. In fig. 3, *B* i neuriti di due cellule procedono uniti per lungo tratto, senza dividersi e scambiando soltanto delle sottili anastomosi; alla distanza di 0,6 mm. formano una rete molto estesa, della quale soltanto la parte prossimale è compresa nella figura.

Dalla studio delle colture viventi ho desunto in qual modo le fibre si anastomizzano; quest'argomento fu da me trattato in altra pubblicazione (1916, 1) e mi limiterò a riferire brevemente i fatti principali.

1. — Le fibre vengono unite da sottili filamenti (fig. *J*); questi il più sovente regrediscono dopo breve tempo, come sappiamo, e costituiscono perciò delle connessioni transitorie, ma talora diventano vere e proprie fibre anastomotiche, come fu da W. ed M, Lewis dimostrato. Ciò sembra sia avvenuto nel preparato riprodotto a fig. *K*; un filamento di un fiocchetto terminale ha aderito ad un neurite contiguo e si è ingrossato.

Non soltanto i filamenti delle espansioni terminali, come nelle figg. *K*, *L*, bensì delle collaterali che sorgono da punti prossimali del neurite frequentemente si saldano ad altre fibre (fig. *J*); l'adesione deve essere piuttosto intima, il che è dimostrato dal decorso retrogrado che assume la fibrilla anastomotica, quando una fibra cresce più dell'altra (fig. *J*). Nella coltura riprodotta a fig. *J* vediamo che alcune delle fibrille anastomotiche aumentano di spessore e probabilmente sono destinate a formare delle anastomosi permanenti.

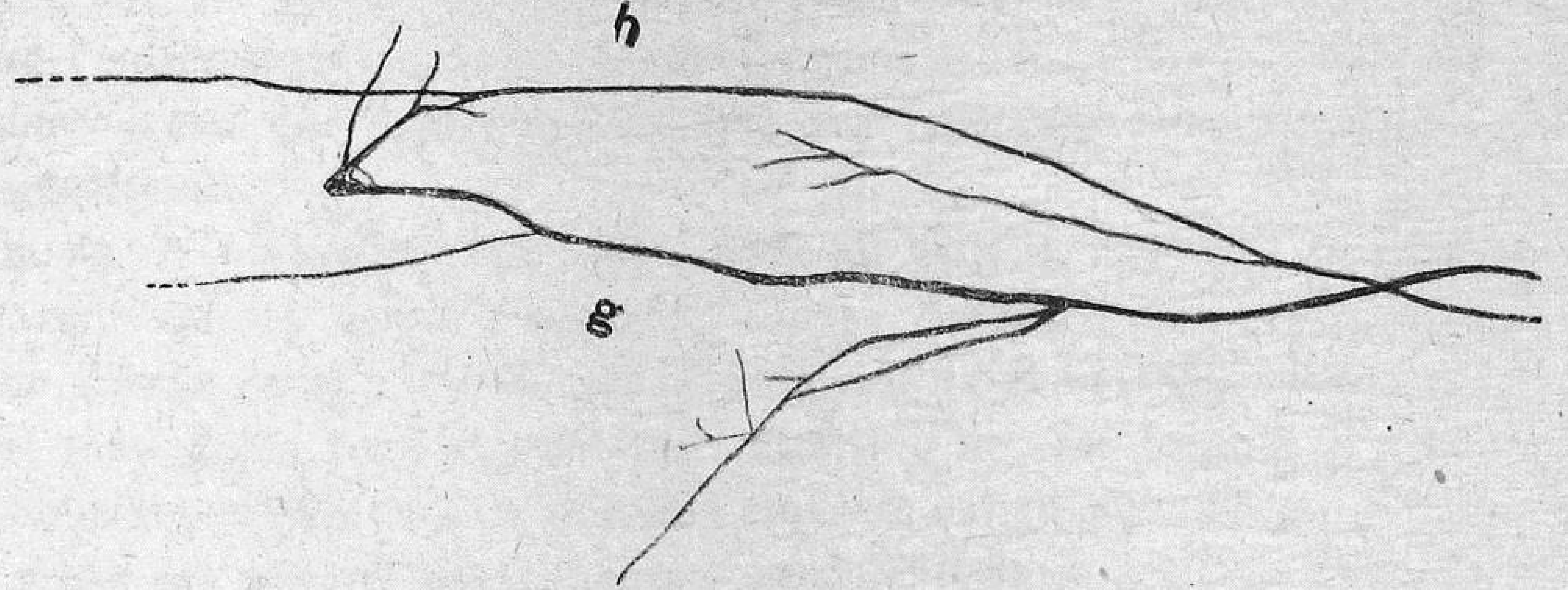


FIG. *K*. — Da una coltura di midollo di un embrione di 4 giorni e 6 ore, fissata alla 22ª ora in Zenker; colorazione con ematossilina Held (13 *E*); si stabilisce un'anastomosi fra 2 neuriti per mezzo di un filamento proveniente dall'espansione di uno di questi. Ingr. 1650 ×

Quando queste ultime sono molto numerose, si formano delle reti del tipo di quelle che abbiamo descritte.

2. — I due ispessimenti terminali di due fibre, oppure di rami di divisione di una stessa fibra, si dirigono l'uno verso l'altro in grazia dei loro movimenti ameboidi e si uniscono; se le due espansioni terminali hanno grandezza diseguale si stabilisce fra le due una specie di equilibrio, ingrossando l'una a spese della sostanza dell'altro; e quando le due fibre terminano con dei rigonfiamenti, la massa protoplasmatica scorre lungo l'arcata che si è formata per l'anastomosi delle fibre (fig. *L*). Dimostrazione più convincente non la potremmo imaginare della fusione che è avvenuta in quei casi fra le due fibre; perchè se fra di esse vi fosse stato un semplice contatto non sarebbe avvenuto uno scambio di sostanza.

Anche delle connessioni apparentemente tanto intime possono essere definitive, ma non lo sono necessariamente. Nell'esempio riprodotto a fig. *L* le due fibre dopo qualche tempo riprendono la loro indipendenza e continuano a crescere.

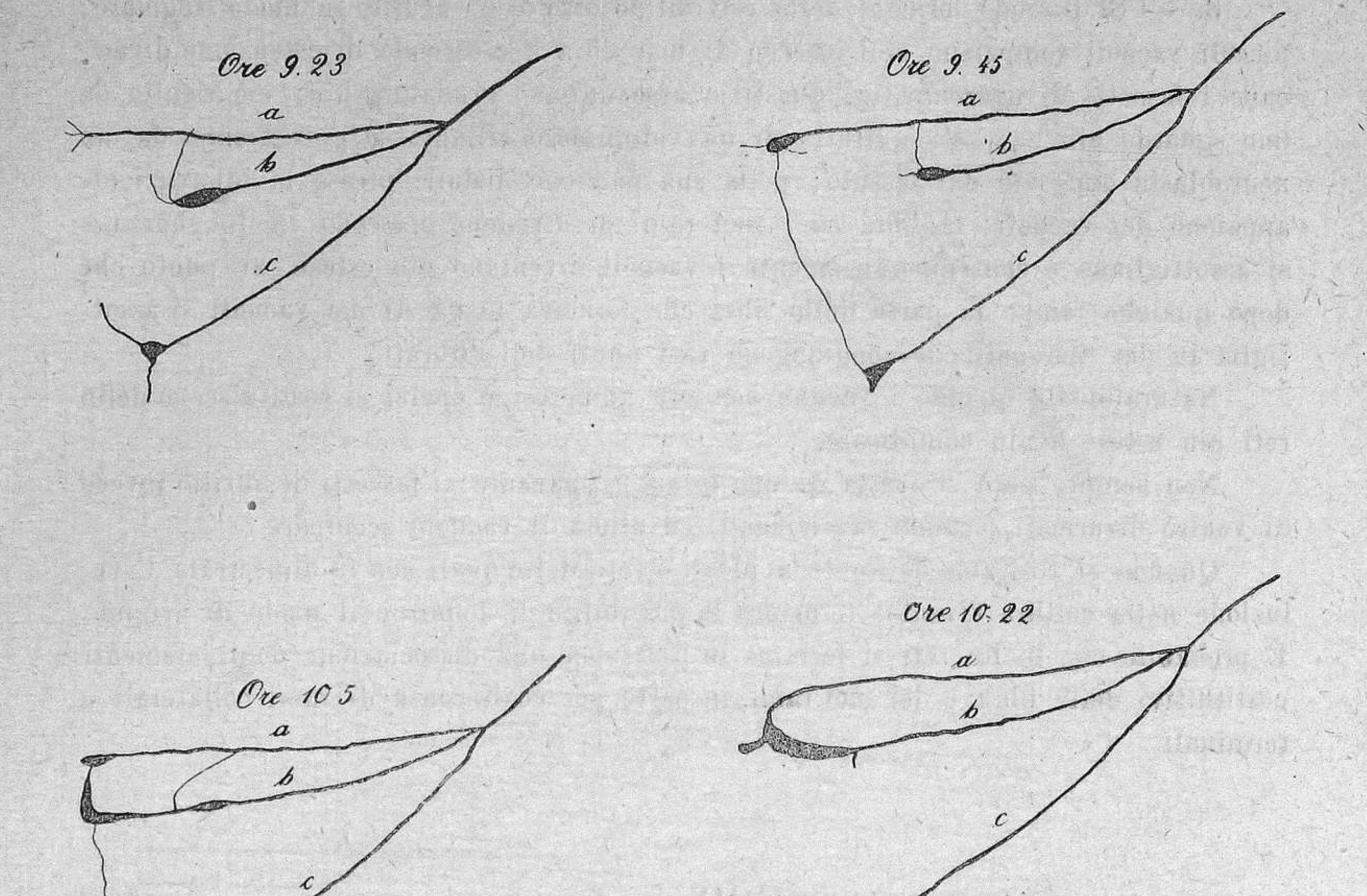

Ore 9.23
a
b
c
Ore 9.45
a
b
c
Ore 10 5
a
b
c
Ore 10.22
a
b
c
Ore 11
a
b
c
Ore 11.10
a
b
c

Fig. *L.* — Da una coltura di 18 ore di un frammento di rombencefalo di un embrione di 4 giorni e 6 ore. Temp. 39°. Varie anastomosi fra i rami di divisione di una fibra; unioni transitorie per sottili filuzzi; anastomosi ad arcata fra due fibre, ma anche questa scompare.

3. — Si possono formare delle reti sul decorso di un neurite in modo singolare; piccoli vacuoli compaiono nell'interno di una fibra e crescendo di estensione divaricano i fascetti di neurofibrille; questi si assottigliano gradatamente; ciò risulta da uno sguardo alla fig. *M*; si tratta di un voluminoso cilindrasse proveniente da un neuroblasta emigrato dal tessuto; nella sua porzione distale, presso la biforcazione, appaiono dei vacuoli; la fibra ed i suoi rami di divisione crescono in lunghezza e si assottigliano e contemporaneamente i vacuoli diventano più estesi, al punto che dopo qualche tempo la parte della fibra che formava le pareti dei vacuoli si assottiglia in dei filamenti che congiungono varî punti della fibra.

Naturalmente quando i vacuoli son più numerosi e sparsi si costituiscono delle reti più estese e più complicate.

Non sempre però si tratta di una forma permanente; i fascetti di fibrille invece di venire divaricati possono ravvicinarsi, ed allora il vacuolo scompare.

Quando ci troviamo di fronte a plessi o reti, delle quali non fu dimostrata l'evoluzione nella coltura vivente, ci manca la possibilità di definirne il modo di origine. È probabile che molte reti si formino in parte per una dissociazione degli elementi costituitivi della fibra e dei suoi rami, in parte per coalescenza di rami collaterali e terminali.

IV.

Neuriti riuniti in cordoni. Formazione di plessi e di reti.

In moltissime colture ho veduto sorgere dalla periferia del pezzo dei fasci indipendenti, oppure anastomizzati fra loro a plesso; hanno struttura fibrillare e forma lamellare, e questa diveniva più pronunziata a qualche distanza dall'origine della fibra.

Il loro calibro era variabilissimo; talora molto voluminosi, altre volte a mala pena più grossi di una fibra isolata (confronta in fig. *P*, *d* con *e*, *f*). Per i primi verun dubbio poteva sussistere che si trattasse di un complesso di neuriti, ma per altri rimanevo spesso perplesso, non potendosi escludere fossero dei cilindrassi isolati di volume insolito.

Ma ogni dubbio fu eliminato quando ho potuto convincermi che questi cordoni risultano dalla convergenza di varî cilindrassi, e spesso fui in grado di seguire ciascuno di questi sino al neuroblasta di origine rispettivo.

La convergenza dei neuriti in un fascio avveniva talora al margine del pezzo (fig. 16) ed era possibile di rendersene conto, se quest'ultimo era sufficientemente trasparente. Oppure i neuroblasti erano emigrati dal tessuto ed allora l'origine delle fibre era evidentissima; in qualche caso i neuroblasti erano disposti radialmente ed i cilindrassi si raccoglievano subito in un fascio ristretto, sì da rammentare singolarmente l'origine di un nervo spinale di moto; oppure erano scaglionati per un certo tratto e la convergenza dei neuriti avveniva ad una distanza maggiore o minore (figg. 4, 5). Od infine i cilindrassi decorrevano distinti nel plasma per un tratto che

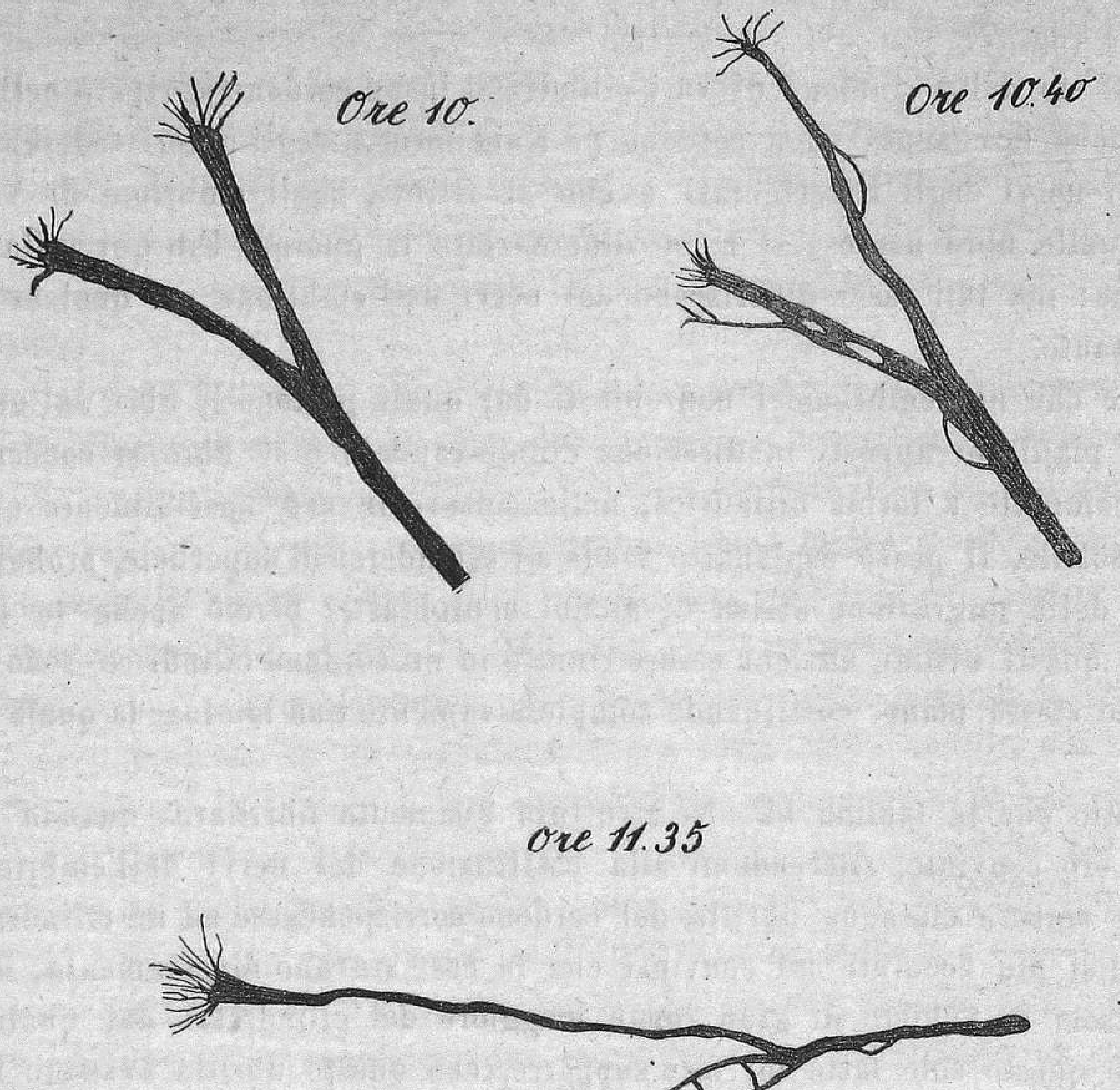


Fig. *M.* — Da una coltura di 30 ore di un frammento di rombencefalo di un embrione di 3 giorni e 16 ore. Temp. 39°. Nei due rami di divisione di un neurite (il neuroblasta di origine, emigrato nel plasma, si trova a grande distanza) appaiono dei vacuoli, i quali estendendosi formano delle larghe maglie.

poteva anche essere lunghissimo (sino a 50 μ e più) e si riunivano a distanza dalla loro origine (fig. 7).

Per effetto della riunione di varî cilindrassi in un cordone si ripete nelle colture la disposizione fascicolata od a cordone (« Kabelform » degli autori tedeschi), che è tipica per i nervi degli Invertebrati e che si ritrova negli embrioni di Vertebrati prima che nelle fibre nervose si siano differenziate le guaine. Fin qui nulla di insolito adunque; ma tali fasci differiscono dai nervi dell'embrione per qualche particolare importante.

Mentre che nell'embrione i neuroblasti dai quali partono le fibre del nervo sono disposti in piani sovrapposti in direzione cranio-caudale e le fibre si concentrano in un fascio compatto a forma cilindrica, nelle colture invece, specialmente quando il coagulo è sottile, il pezzo esplantato tende ad estendersi in superficie, probabilmente per effetto della migrazione attiva di alcuni neuroblasti; perciò anche le fibre che partono da questi ultimi, anzichè essere riunite in un cordone cilindrico, sono disposte tutte in uno stesso piano, costituendo complessivamente una lamina, la quale aderisce al vetrino.

Ho detto che la lamina ha una struttura finamente fibrillare; quando iniziai i miei studî ero convinto, riferendomi alla costituzione dei nervi dell'embrione, che anche nelle colture ciascuna fibrilla del cordone corrispondesse ad un cilindrasse, ma con un'analisi più accurata mi convinsi che le cose stavano diversamente; le fibrille sono nel fascio in numero di gran lunga maggiore dei cilindrassi dai quali esso è costituito, e questo solo fatto mi fece supporre, che queste fibrille avessero il valore di elementi costitutivi dei cilindrassi.

Se non m' inganno, la stessa disposizione si aveva in una coltura riprodotta da Burrows (1911); la descrizione che quest'autore ne dà non è diversa dalla mia: « The individual neurofibrillae are shown clearly in the staided preparations. The larger bundles appear as twisted rope-like strands or flat layers of delicate fibrillae (fig. 4) . . . ».

Per quanto Burrows non affermi in modo esplicito, che i neuriti del cordone si risolvono in neurofibrille, è fuor di dubbio che quest'autore attribuisce ai costituenti elementari del fascio il valore di neurofibrille e non di cilindrassi.

Per poter interpretare al suo giusto valore tale modificazione nella costituzione dei fasci, è opportuno che noi consideriamo in queste stesse colture il comportamento particolare di alcuni cilindrassi isolati.

Nella mia fig. 4 il neurite *R* è sottile all'origine e dopo breve tratto si slarga in un nastro, nel quale si rende manifesta una struttura finamente fibrillare non visibile nel tratto prossimale.

Orbene, se parecchi neuriti riuniti in un cordone subiscono la medesima trasformazione come nelle figg. 4, 5, 7, in tutto il fascio diviene palese la struttura fibrillare dei singoli cilindrassi ed allora evidentemente le neurofibrille hanno il valore di elementi costitutivi di quei cilindrassi i quali si riuniscono a formare il fascio.

Si potrebbe supporre che tale modificazione di struttura fosse un artefatto dipendente da imperfetta fissazione; ma prescindendo dalla circostanza che essa si distingue anche nelle colture viventi, ricorderò, che nelle stesse colture nelle quali abbondano i fasci fibrillari, mi accadde di vedere dei neuriti riuniti in cordoni a forma cilindrica, i quali mantengono in tutto il loro tragitto la loro individualità, proprio come nei nervi dell'embrione, senza dissociarsi in neurofibrille (fig. 6). Questo avviene quando le fibre che crescono nella coltura hanno trovato un substrato di cellule mesenchimali e si insinuano fra il vetrino e le cellule; il cordone riprodotto nella fig. 6 è formato da sette cilindrassi, ben distinti l'uno dall'altro in tutto il tragitto (confronta con la fig. 23 della stessa coltura nella quale un fascio è dissociato in neurofibrille).

Ho ricordato più sopra che Burrows aveva notate queste differenze nella costituzione dei fasci, ed anche per quel che riguarda i fattori che le determinano io mi associo alla sua interpretazione. Burrows afferma infatti che i cordoni quando trovano una densa rete di fibrina sono compatti ed hanno forma rotondeggiante. Invece i nervi che crescono in un mezzo lasso, oppure alla superficie del coagulo si espandono in uno strato appiattito di fibrille. Nel caso nostro il substrato formato dalle cellule mesenchimali ha la stessa funzione stereotropica del denso coagulo di fibrina. Quando invece i fasci crescono in un coagulo sottile e lasso senza cellule, essi si adattano a questo mezzo meno favorevole al loro accrescimento espandendosi in una sottile lamina, che aderisce alla faccia inferiore del vetrino, oppure alla superficie del coagulo.

Dirò ora del modo con cui si svolge l'accrescimento dei fasci fibrillari. Dapprima guidato dal preconcetto, che questo avvenisse in modo analogo a quello che riteniamo tipico per i nervi dell'embrione, supponevo che ciascun neurite fosse indipendente e che l'accrescimento in lunghezza del fascio fosse semplicemente la risultante dell'accrescimento individuale delle singole fibre.

Ma nell'approfondire le mie ricerche mi convinsi che si tratta proprio di un movimento di massa e che in questi fasci l'attività di accrescimento individuale dei singoli neuriti si cancella, fin dal momento in cui incominciano ad invadere il coagulo; l'estremità si espande in un ciuffo di sottili filamenti proveniente da tutta la massa neurofibrillare del fascio (figg. 8 e 9), oppure terminano con mazze ameboidi grossolane ed irregolari, dalle quali si irradiano sottili filamenti; nessun dubbio che la forma irregolarissima delle due espansioni della fig. 10 indica un movimento ameboide di tutta la massa neurofibrillare; e tale imagine ci permette di affermare, che fra i costituenti elementari del fascio deve avvenire uno scambio di sostanza, perchè se il suo accrescimento fosse avvenuto per attività individuale dei singoli neuriti, si rintraccierebbero almeno in qualche punto le espansioni singole; invece questa figura dimostra l'esattezza della mia affermazione, che si tratta di un movimento ameboide di massa.

Inoltre studiando attentamente varie fasi di sviluppo di uno stesso fascio (fig. *N*) ritrassi la convinzione che esso cresce come una massa unitaria, quasi che fosse una fibra enormemente ingrandita.

Quando i varî neuriti mantengono la propria indipendenza, come nei nervi dell'embrione e talora nelle colture (vedi più sopra), essi procedono per un un certo tratto riuniti, ma poi si separano, per ricongiungersi più oltre; nell'embrione, come appare da alcune figure di Held, singoli neuriti si separano dal nervo a varia altezza e terminano con una mazza terminale ben distinta da esso. Nulla di tutto ciò si osserva nel caso nostro. Il fascio cresce senza che l'individualità delle fibre da cui esso è costituito si manifesti, nè lungo il suo tragitto, nè nella sua espansione terminale.

A documentare anche meglio la solidarietà esistente fra tutti i neuriti di un fascio, riferirò il seguente particolare: noi abbiamo detto che le espansioni terminali possono durante fasi determinate divenire omogenee: ebbene noi vediamo (fig. *N*)

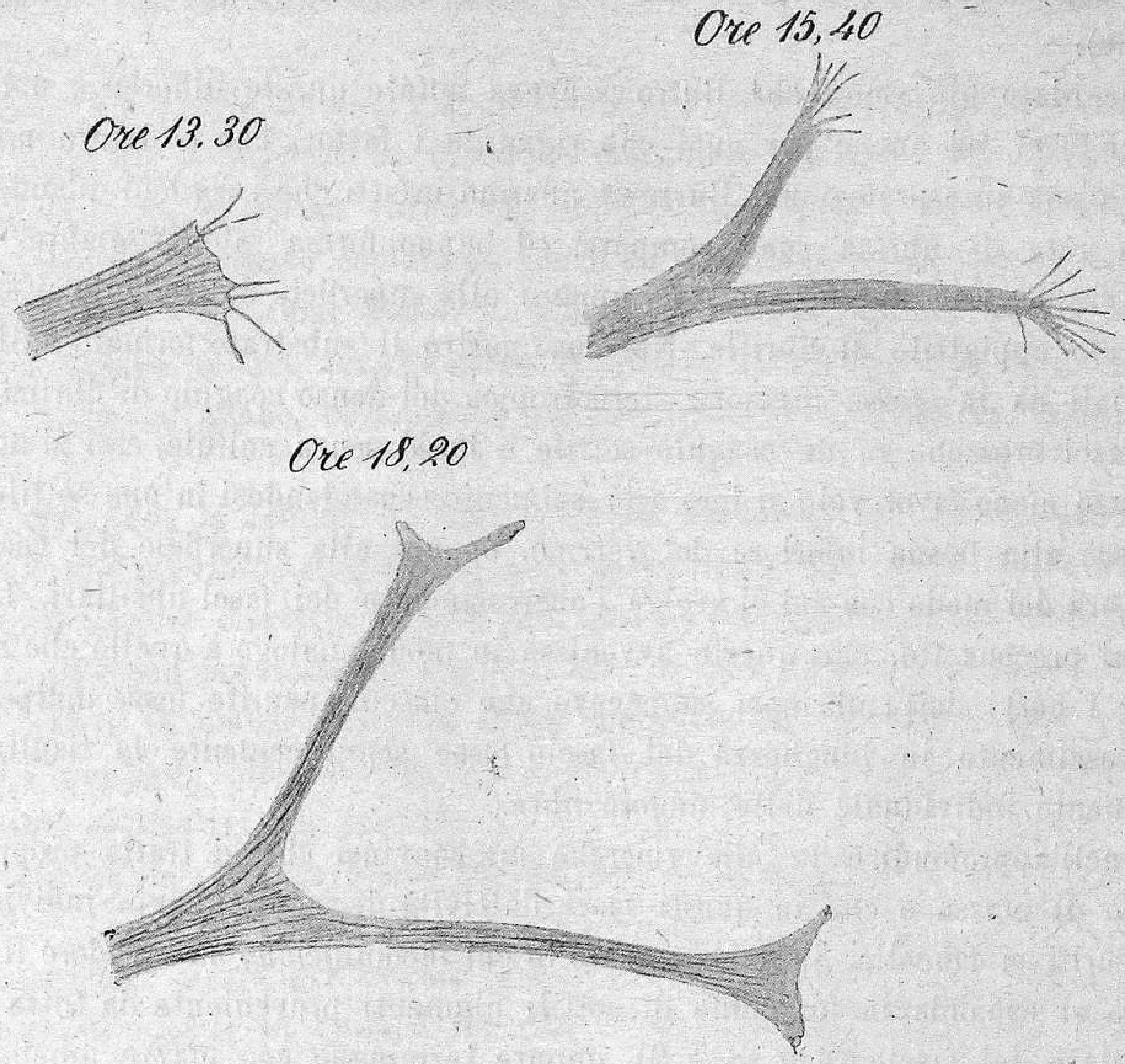


Fig. *N*. — Da una coltura di un frammento di rombencefalo in plasma diluito nella proporzione di 1:3 in siero di sangue (20 *A*); osservazioni nella coltura vivente alla 27ª ora. Modificazioni nell'espansione terminale nei due tronchi di divisione di un grosso fascio fibrillare.

che questa modificazione avviene anche nelle espansioni dei fasci fibrillari, proprio come se questi fossero delle unità; se le varie fibre mantenessero la loro attività individuale, mal si concepirebbe come l'espansione possa modificare in blocco così profondamente la sua costituzione.

Queste formazioni di cui abbiamo cercato di definire il valore strutturale e le modalità di accrescimento, dopo un certo tratto si ramificano; i rami provenienti dalla loro divisione possono suddividersi ulteriormente e terminare liberamente; oppure si anastomizzano e ne derivano dei plessi talora molto complicati.

Infine vediamo ripetersi per i fasci le strutture che descrivemmo per i neuriti isolati; ma in questo secondo caso i rami collaterali e le maglie del plesso hanno un valore problematico. È evidente che se nei fasci non è più possibile di rintracciare l'individualità dei varî cilindrassi, ciò riescirà anche più difficile nelle complicate anastomosi che avvengono fra i rami di divisione di quelli.

Incominciamo dalle disposizioni più semplici e più facili ad interpretarsi.

Nella fig. 7 i neuriti di due neuroblasti si riuniscono in un filamento unico *b*; il diametro di questo va aumentando distalmente e vi si rende palese una struttura fibrillare; più oltre si divide in due rami, che si anastomizzano col neurite del neuroblasta *c*; si forma così un plesso relativamente semplice, che più oltre si ricostituisce in un largo fascetto fibrillare; da quest'ultimo parte più distalmente una fibra sottile, che termina come di consueto in un'espansione.

Ora tale disposizione è suscettibile di due interpretazioni; è possibile che la scomparsa dell'individualità dei neuriti nel fascio fibrillare sia soltanto apparente, ed in tal caso i fascetti del plesso sono costituiti da rami di divisione dei tre neuriti, confusi solo apparentemente in una massa fibrillare. Oppure l'individualità dei neuriti si è cancellata tanto nel fascio principale che nelle trabecole del plesso.

I fatti da noi rilevati nell'accrescimento di questi fasci fibrillari e che furono esposti poco fa, ci fanno propendere per la seconda supposizione.

Nelle figg. 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 i fasci si costituiscono per riunione di varî neuriti, ed essi formano delle arborizzazioni e dei plessi più complicati e più estesi che negli esempî sopra riferiti; evidentemente la differenziazione di queste imagini più complesse ha richiesto un periodo di tempo molto maggiore che nel primo caso.

Nelle figure 8 e 9 si nota un accenno alla riunione in gruppi dei filamenti dell'espansione terminale, e questo indica un'incipiente suddivisione in tronchi secondarî. Nella fig. 10 è avvenuta la suddivisione del fascio in due rami fra loro anastomizzati; delle caratteristiche delle due espansioni della fig. 10 ho detto poco fa.

Nella fig. 11 dall'estremità espansa del fascio principale *d* si diparte un fascio secondario, il quale si suddivide; ciascuno dei tre rami si espande in una mazza terminale. I rilievi che si vedono all'estremità del fascio principale indicano che altri rami secondarî sono in procinto di partirsi da esso.

Nella fig. 12 varî tronchicini collaterali si dipartono dal tronco principale; questo si biforca in due grossi fasci secondarî, che si dissociano alla lor volta in fibre sottili; molte di queste si ricongiungono al tronco a varia distanza dal punto di partenza.

Il plesso della fig. 13 è prevalentemente costituito da sottili fibre, alcune delle quali traggono origine direttamente dal pezzo esplantato, altre dai fasci; anastomosi si stabiliscono per incontro ad angolo acuto di fibre provenienti anche da punti lontani.

La fig. 14 differisce dalle precedenti per i seguenti particolari; il tratto prossimale del tronco si anastomizza in varî punti (*b*) coi fasci secondarî che ne partono, sì da risultarne una complicata disposizione a plesso; inoltre delle fibrille che si separano dal tronco principale si riuniscono a ventaglio in cordoncini compatti (in *b*); infine sottili fibre provenienti dal fascio principale si riuniscono dopo un lungo tragitto in un cordoncino a costituzione fibrillare, il quale si dissocia di nuovo in fibre sottili (in *a*). Parimenti nella fig. 21 vediamo fibre molto sottili, che dopo essersi anastomizzate formando una complicata rete, si ricostituiscono in un grosso tronco *d*.

Nella fig. 15 i fascetti di fibre ed anche le fibre sottili provenienti da risoluzione del tronco principale (il quale è brevissimo) si sono considerevolmente accresciute in confronto alle colture riprodotte nelle figure precedenti (si consideri che la fig. 15 fu riprodotta a debole ingrandimento); anche in questa figura varie fibre si riuniscono dopo un certo tragitto al tronchicino da cui sono partite, oppure ad un tronco vicino; ne risultano dei plessi, che in qualche punto hanno una complicazione rilevante.

Le arborizzazioni, i plessi e le reti riprodotte nelle figg. 16, 17, 18 ed anche nelle figure di dettaglio 23-28, tratte tutte da un'unica ricchissima coltura, che fu colorita col metodo Cajal, differiscono dalle imagini fin qui descritte per la maggiore estensione delle arborizzazioni dei singoli fasci, tanto più se si tiene conto che questi risultano da un numero limitato di neuriti. Apparentemente almeno queste figure si avvicinano più delle altre a quelle tipiche per i nervi dell'embrione. Ma in realtà sussiste anche in questa coltura la sostanziale differenza su cui abbiamo tanto insistito; i tronchi prendono subito una forma lamellare ed i neuriti che li costituiscono si dissociano in fibrille, costituendo un fascio nel quale l'individualità dei singoli neuriti è scomparsa (fig. 18, 23).

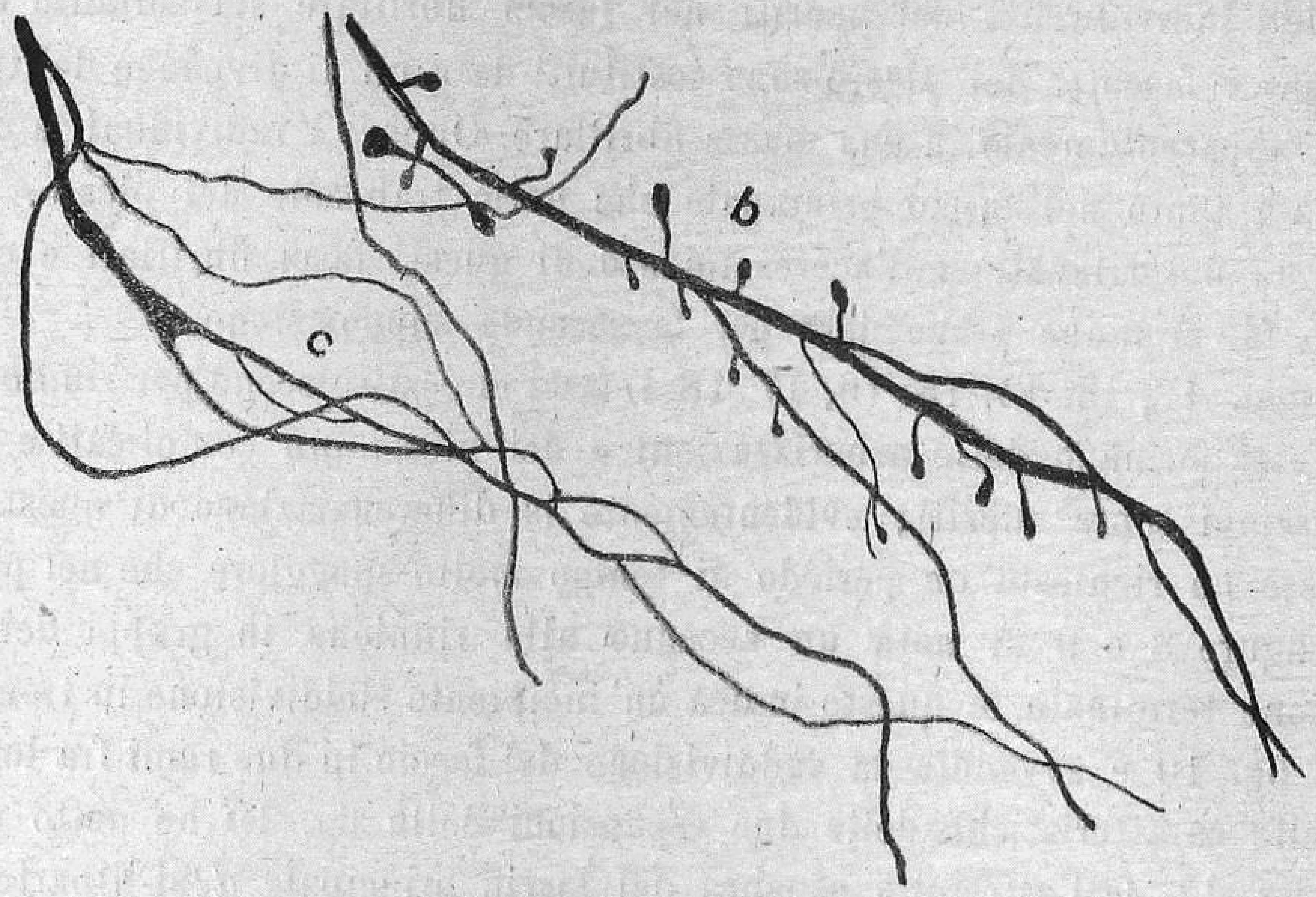


Fig. *O*. — Due rami della fibra *a* nella fig. 17, in *o* (coltura 14 *Q*), molto ingranditi. Il ramo *b* ha molte appendici con rigonfiamento terminale; dalla fibra *c* partono molti rami che si ricongiungono alla fibra principale. Ingr. 1650 ×

Il lungo fascio della fig. 16 trae origine da riunione di 4 neuriti, dopo breve tratto aumenta in larghezza e vi riconosciamo una struttura finamente fibrillare; la sua arborizzazione avviene secondo il tipo monopodico, cioè esso conserva la sua individualità per un lungo tratto (ha una lunghezza di circa 0,8 mm.); i rami collaterali si dividono ed in parte terminano liberamente, in parte si anastomizzano fra loro, oppure sottili fibre si ricongiungono al tronco principale.

Invece la complessa arborizzazione del fascio *a* nella figura 17 avviene piuttosto secondo il tipo dicotomico; le anastomosi si stabiliscono in prevalenza fra i rami più sottili; nella fig. *O* è riprodotta a forte ingrandimento una rete a strette maglie della fig. 17, punto *o*. Le arborizzazioni dei fasci *b* e *c* della stessa fig. 17 si avvicinano al tipo monopodico; varie anastomosi avvengono fra i rami di questi due fasci; una di queste (punto *x* nella fig. 17) fu riprodotta fortemente ingrandita a fig. 24.

Il fascio *c* deve la sua origine alla riunione di 6 neuriti (fig. 17) e dà nel suo lungo decorso molti rami, i quali si suddividono e si anastomizzano fra loro, oppure si ricongiungono al tronco principale; una parte della vasta rete che risulta da queste anastomosi fu riprodotta a forte ingrandimento a fig. 18.

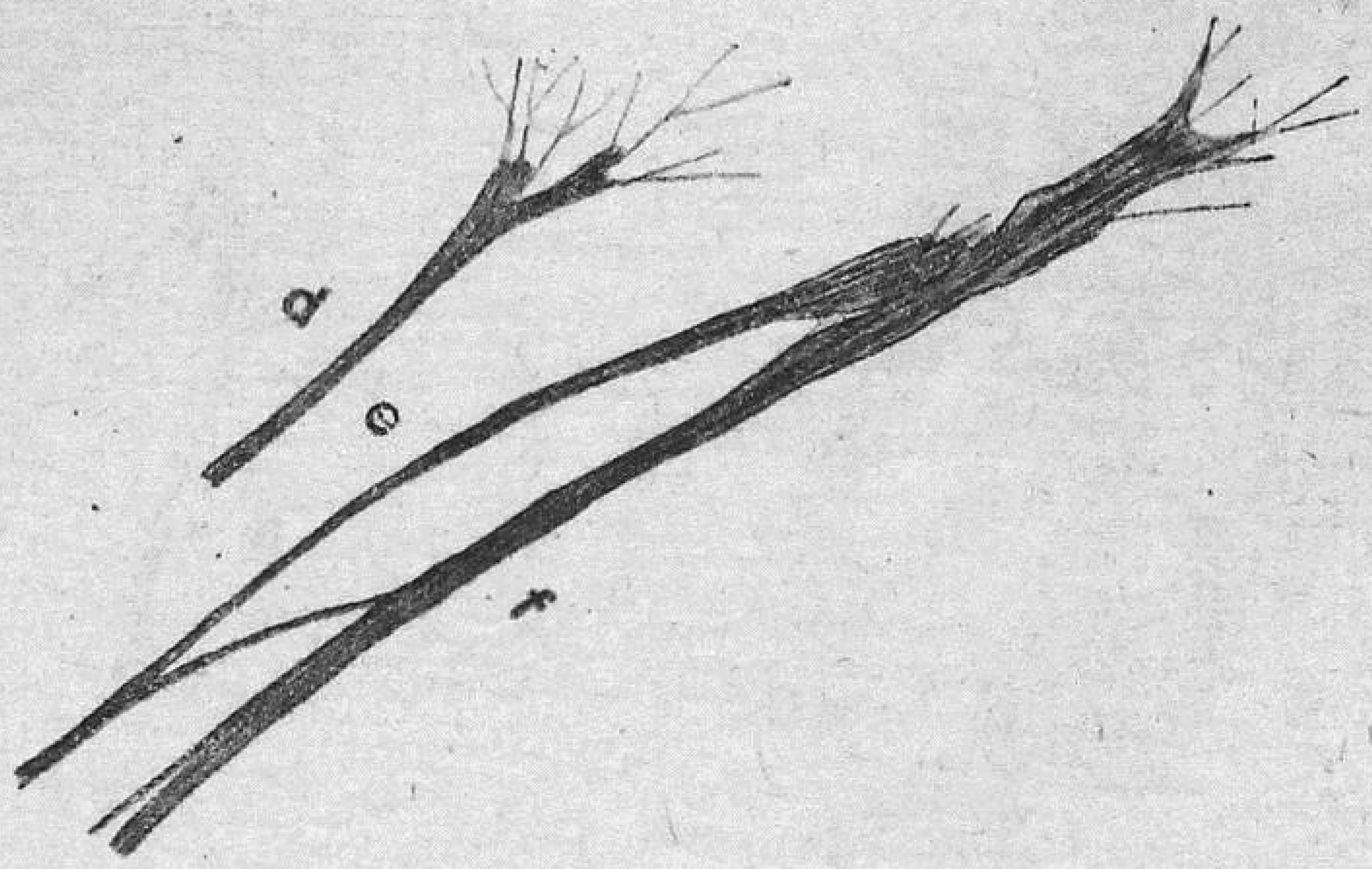


Fig. *P*. — Espansioni terminali di fibre che provengono da un fascio fibrillare; la fibra *d* parte dal tratto iniziale del tronco; le fibre *e*, *f* da un piccolo plesso formato da rami del fascio suddetto. Da una coltura di embrione di 3 giorni e 6 ore, fissata alla 45ª ora in liquido Maximow. Ematossilina Held. Ingr. 1650 ×

Si noti che tanto il fascio della fig. 16, che i fasci *a*, *b*, *c* della fig. 17 provengono tutti dallo stesso frammento di tessuto.

Di rado ho potuto seguire nella coltura vivente l'evoluzione di questi plessi e reti; ma non vi può essere dubbio che le anastomosi sono per lo più secondarie; dapprima i fasci fibrillari ed i loro rami terminano con espansioni libere (figg. 27, 28), e successivamente si anastomizzano nel modo da me descritto a pag. 154 e seg.

È certo però che in qualche coltura i cordoni sono sin dal momento in cui divengono visibili nel plasma fra loro uniti; lungo il contorno del pezzo appare un reticolato a trabecole grossolane ed a maglie ristrette (figg. *Q*, *R* in *A*); più tardi quelle trabecole vengono stirate e si assottigliano; le lacune diventano più ampie ed arriviamo così alla struttura riprodotta nelle figg. 20, 21: cospicui fasci fibrillari congiunti da arcate anastomotiche.

Poichè le trasformazioni che avvengono nel tessuto esplantato si sottraggono all'osservazione, il valore di questi fatti mi sfugge; forse ulteriori perfezionamenti del metodo ci permetteranno di chiarirli in avvenire.

Più frequente è la differenziazione di reti per accumulo di liquido nello spessore dei fasci fibrillari; si tratta di un fenomeno analogo a quello descritto a pag. 158. Nello spessore dei fasci si formano delle lacune piene di liquido interfibrillare, analogamente a quanto abbiamo osservato nell'interno di alcuni cilindrassi; le lacune aumentano di estensione e divaricano i fascetti fibrillari, che le delimitano (fig. 9); questi, per effetto della distensione che subiscono, si assottigliano sempre più, quanto più inoltrata è l'età della coltura.

Tale origine ha certamente la rete a grosse e strette maglie *b* della fig. 20, come pure le lacune allungate che sembrano scavate nel fascio fibrillare *a* in fig. 19.

Interessanti riescono le osservazioni eseguite durante la vita della coltura riprodotta a fig. 20; nella parte distale del tronco *A* sono apparse, in seguito ad accumulo di liquido interfibrillare delle lacune; si è così costituita l'intricata rete *b*; più distalmente i fascetti fibrillari si ricostituiscono nel tronchicino *c*, in origine brevissimo, ma che cresce rapidamente in lunghezza per effetto del movimento ameboide della sua espansione; quest'ultima fu riprodotta molto ingrandita a fig. *S*.

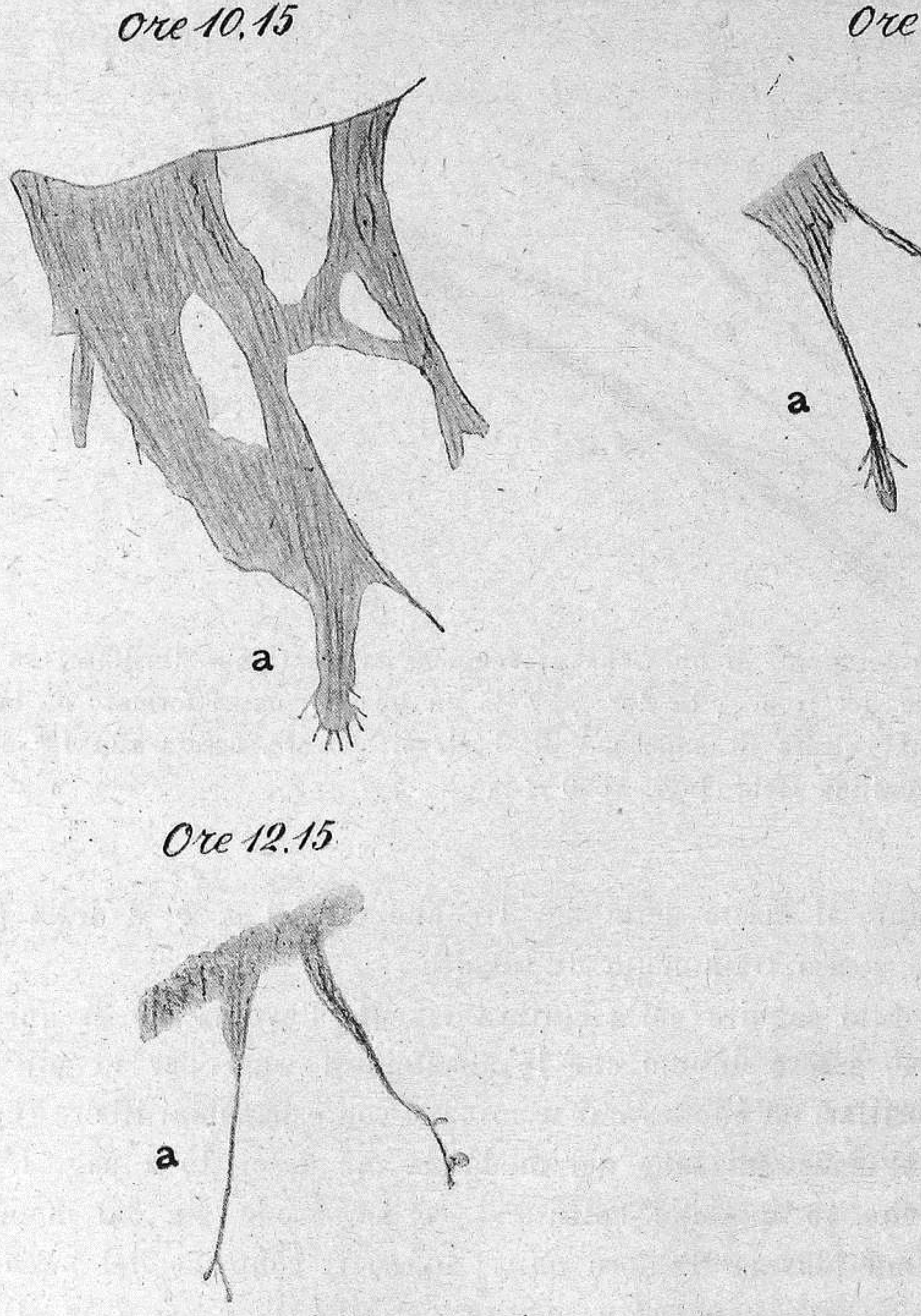


Fig. *Q*. — Da una coltura di 20 ore di un embrione di 4 giorni, studiata vivente; grossi tronchi fibrillari formano un grossolano trabecolato. Modificazioni dell'espansione di uno di questi.

Origine non molto diversa io attribuisco ai plessi che troviamo spesso nel tratto prossimale dei tronchi (fig. 14, *b*), od a plessi molto più complicati, qual'è quello riprodotto a fig. 22.

Trovai poi in varie colture dei reticoli che sono tesi per tratti relativamente estesi fra i cordoni fibrillari; sono caratterizzati da grande sottigliezza delle fibre e dalla frequenza delle anastomosi, ed anche da una certa uniformità nell'ampiezza delle maglie (figg. 19, 21). Sulla loro origine non mi formai un'opinione precisa.

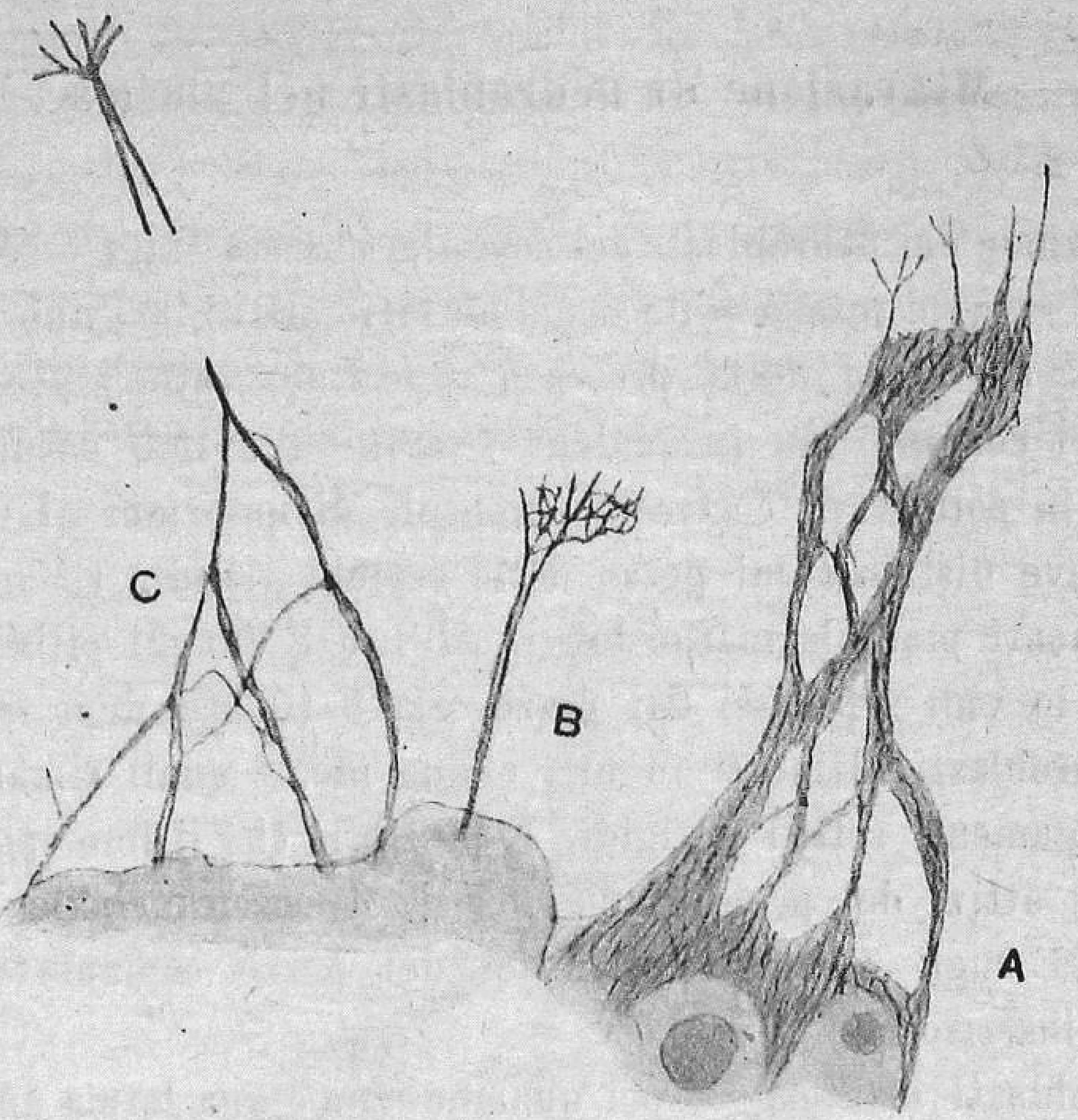


Fig. *R.* — Varî fascetti anastomizzati a plesso. Da una coltura di un embrione di 4 giorni e 6 ore, fissata alla 22ª ora in Zenker; ematossilina Held (13 *E*). Ingr. 1650 ×

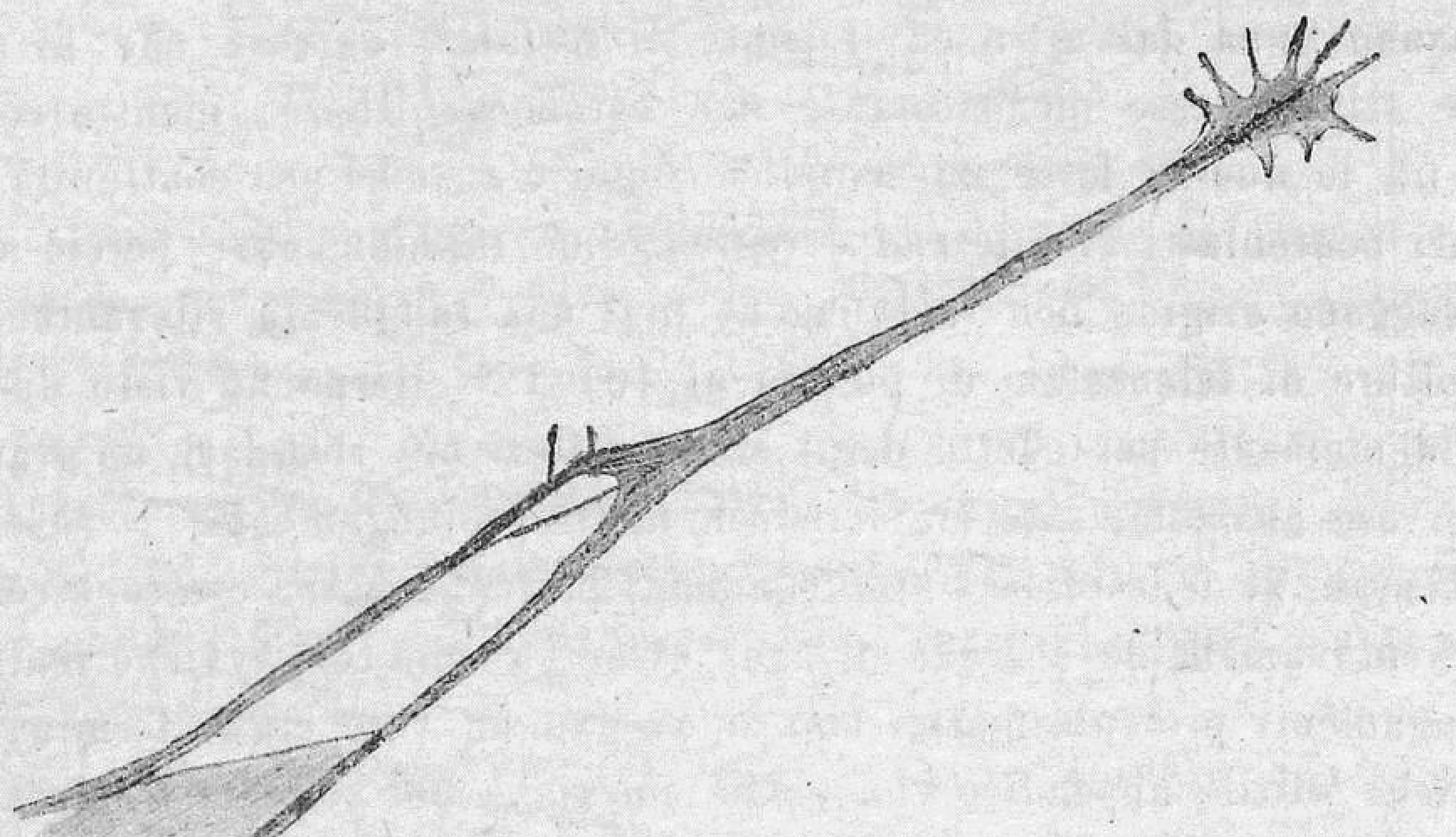


Fig. *S.* — Espansione terminale del fascetto fibrillare *a* nella fig. 20 molto ingrandita (coltura 11 *S*). Ingr. 1470 ×

V.

Migrazione di neuroblasti nel plasma.

Della migrazione dei neuroblasti nel coagulo, che era stata osservata da Harrison negli embrioni di rana ed interpretata come un fatto attivo, noi abbiamo ripetutamente parlato; Burrows fa cenno della presenza di cellule intercalate sul tragitto delle fibre cresciute nel coagulo, ma fa qualche riserva sulla loro natura nervosa.

Ingebritsen in colture di corteccia cerebrale di embrioni al 6°-7° giorno trovò nel plasma a breve distanza dal pezzo delle cellule grandi, ricche di granuli, con 1 o 2 prolungamenti protoplasmatici brevi, ed 1 o 2 lunghi cilindrassi.

Spessissimo io vidi separarsi dal pezzo, già 8-10 ore dopo che fu eseguita la coltura, molti neuroblasti allineati in una o due file, i quali rimangono congiunti al pezzo con prolungamenti sottili e rigidi. È possibile che il loro spostamento sia favorito da movimenti attivi del protoplasma, ma la causa principale ne è certamente la trazione esercitata sugli elementi periferici del pezzo esplantato dai filamenti di fibrina che vi si inseriscono.

Questi neuroblasti mantengono per qualche tempo una forma affusata ed emettono dei neuriti che crescono nel modo consueto. Sono fra loro congiunti da filamenti anastomotici, che probabilmente preesistevano nel pezzo esplantato e si sono resi manifesti per effetto dello spostamento delle cellule nel plasma.

La connessione fra queste cellule non è soltanto apparente; quando due cellule si allontanano l'una dall'altra ed il ponte di sostanza nervosa che le unisce viene fortemente stirato, esse ciononostante non divengono libere; mentre così dovrebbe essere se fra le due vi fosse un semplice contatto anzichè una continuità di sostanza.

Questi neuroblasti si alterano e regrediscono rapidamente; perciò le fibre che da essi traggono origine non raggiungono mai una lunghezza rilevante.

In colture di telencefalo di pulcini al 10° - 12° giorno ho visto discostarsi dal pezzo, evidentemente per effetto degli stessi fattori ora ricordati, un gran numero di cellule nervose anastomizzate tra loro con molti prolungamenti.

Ho tentato di definire, se i prolungamenti protoplasmatici crescono come i neuriti per movimento ameboide e credo di aver osservato che così avviene realmente; però nei prolungamenti protoplasmatici non si osserva un vero ciuffo terminale, ma soltanto qualche sottile appendice che viene emessa e poi retratta. Talora ho notata l'emissione di prolungamenti protoplasmatici transitorî, che dopo breve tempo dalla loro comparsa venivano retratti. Io ritengo fermamente adunque che anche l'emissione e l'accrescimento di questi prolungamenti sia un fenomeno di ameboidismo.

Anche queste cellule multipolari avevano una durata di vita breve.

Maggiore interesse hanno per noi quei casi nei quali dei neuroblasti isolati, provenienti di solito da pezzi piccolissimi (pag. 144), si spostano tardivamente verso la 20ª - 30ª ora nel coagulo, oppure nella zona di plasma fluidificato tra il tessuto ed il plasma; allora la vita della cellula può durare assai più a lungo (figg. 2, 3, 4, 5, 7, 17, 19; *E*, *H*, *I*, *T*).

Lo spostamento della cellula può precedere la differenziazione del neurite, ma può anche seguirla (fig. *H*). In quanto alle cause dello spostamento del corpo cellulare, è possibile che, come per il caso considerato in precedenza, vi abbiano parte tanto la trazione esercitata dalla fibrina, che dei movimenti attivi del protoplasma, sebbene sia difficile di renderci conto come tale trazione si manifesti con tanto ritardo. Forse le cause della migrazione non sono sempre le stesse in tutte le colture.

Sovente essa è grandemente facilitata dalla disgregazione degli elementi contigui, dimodochè si avrebbe quasi una dissociazione spontanea delle cellule rimaste viventi.

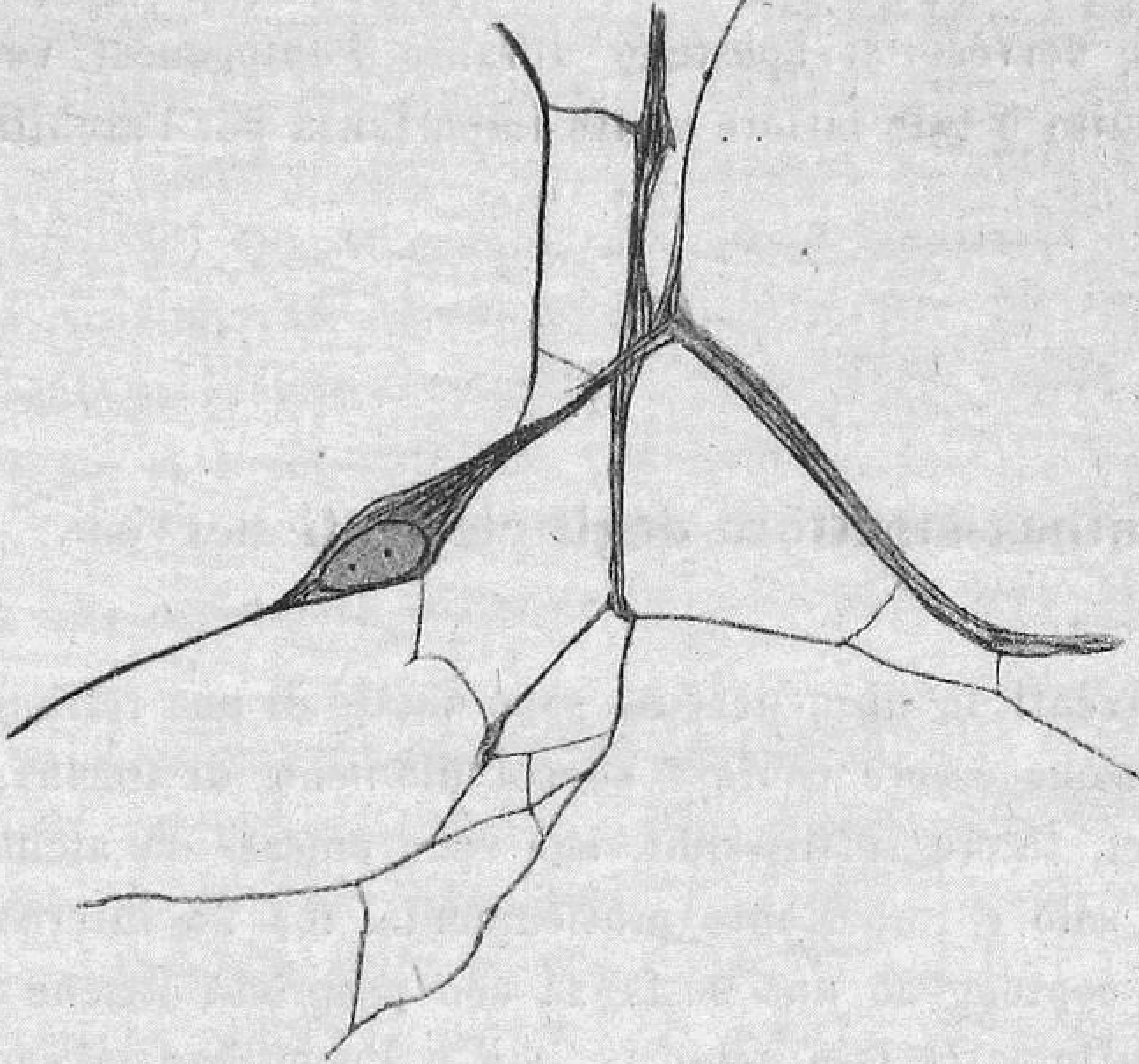


Fig. *T*. — Neuroblasta con prolungamenti che si anastomizzano a rete con altre fibre. Coltura di lobo ottico di un pulcino al 9° giorno, fissata in Zenker alla 30ª ora. Ematossilina Held. (IV *B*). Ingr. 750 ×

Delle anastomosi fra fibre provenienti da neuroblasti emigrati abbiamo detto diffusamente. Quando queste son numerose ed avvengono a breve distanza dall'origine delle fibre, i prolungamenti dei neuroblasti prendono direttamente parte alla costituzione della rete (fig. *T*).

La vitalità dei neuroblasti emigrati dipende da varie cause; ma soprattutto, e quest'è importante, dalle connessioni che la cellula mantiene col pezzo esplantato. Quando la cellula nervosa si libera del tutto dal pezzo, degenera rapidamente; quando invece resta unita ad esso con uno o due prolungamenti sopravvive per lungo tempo; la prova obbiettiva della sua vitalità si ha nell'attività ameboide del neurite.

Anche i neuroblasti emigrati, come le cellule mesenchinali, si distendono dopo qualche tempo sulla faccia inferiore del vetrino in una lamina sottile. Ma mentre nelle cellule mesenchimali tale fenomeno è compatibile colla loro integrità, sembra che nei neuroblasti non possa conservarsi a lungo una struttura normale in queste condizioni; ben presto appaiono nel citoplasma delle grosse granulazioni refrangenti. Contrariamente a quanto si potrebbe supporre, nonostante quella modificazione di struttura, la vita del neuroblasta non è immediatamente compromessa, perchè il ciuffetto terminale del neurite resta per qualche tempo attivissimo ed il cilindrasse cresce in lunghezza. Soltanto quando i granuli diventano molto grossi ed invadono tutta la cellula, l'accrescimento del neurite diviene irregolare, sul suo decorso si costituiscono delle nodosità; la scomparsa definitiva del ciuffo terminale segna l'arresto del suo accrescimento, e probabilmente il momento della morte della cellula.

Anche Ingebritsen raffigura delle cellule che contengono molte grosse granulazioni nel corpo cellulare e ciononostante il lungo cilindrasse ramificato rimane integro.

La migrazione dei neuroblasti in vitro ha interesse specialmente se messa in rapporto coll'ipotesi di Kappers della neurobiotassi; è noto che quest'autore ha supposto, che le cellule nervose si spostano durante l'ontogenesi verso la sede dello stimolo ed ha attribuito a tale fattore molta importanza per l'architettura del sistema nervoso.

VI.

Intima struttura degli elementi nervosi.

Nelle colture viventi le fibre nervose sono dotate di una refrangenza particolare, per cui esse non possono essere confuse nè coi filamenti di fibrina, nè coi prolungamenti protoplasmatici, talora sottilissimi, che sono emessi da alcune cellule mesenchimali. Questo non solo è importante praticamente, ma ha interesse perchè indica che le fibre nervose contengono una sostanza con proprietà ottiche diverse dal protoplasma delle altre cellule. Il loro contorno non è liscio, ma presenta delle minutissime granulazioni.

La stessa refrangenza caratterizza lo scarso citoplasma dei neuroblasti; e naturalmente di ciò ci rendiamo conto soltanto quando i neuroblasti si sono allontanati dal pezzo (vedi pag. 168 e seg.).

Ma delle fibrille ben individualizzate non si scorgono colla semplice osservazione della coltura vivente nè nel neuroblasta, nè nel neurite.

La struttura del citoplasma del neuroblasta, comprendendo in questa definizione soltanto la parte che si trova in immediata prossimità del nucleo, è difficilmente definibile, data la sua scarsa trasparenza; io ho ricevuto l'impressione, che esso sia costituito da filamenti fittamente addensati e sovrapposti in molti piani; col metodo fotografico le fibrille del corpo cellulare si colorano, non coll'ematossilina molibdica.

L'espandersi dei neuroblasti in lamine protoplasmatiche sottili è accompagnato, come sappiamo, da profonde alterazioni e perciò neppure in tali condizioni, nelle quali l'analisi citologica sarebbe facilitata, è possibile di risolvere il problema della struttura del neuroblasta vivente. M. e W. Lewis (1915) affermano di aver visto dei mitocondri nelle cellule nervose coltivate in vitro; io non ho potuto dimostrarne l'esistenza.

Volgendoci a considerare la costituzione delle fibre, diciamo subito che in quelle più sottili nessuna struttura è visibile, nè nelle colture viventi, nè coi metodi specifici di colorazione; ciò è notissimo anche per le fibre di embrioni precoci di Amnioti, e del resto anche per i sottili cilindrassi del nevrasse dell'adulto. W. e M. Lewis si chiedono se le più sottili fibre risultano di una sola neurofibrilla, e finiscono col risolvere la questione in senso affermativo: esse però possono suddividersi in 2-3 fibrille. Neppure nelle fibre più grosse delle mie colture era visibile distintamente una struttura, finchè la fibra ha una forma cilindrica; ma quando si espande in una lamina, allora diviene manifesta nella coltura vivente, e più distintamente nei preparati fissati, una finissima striatura longitudinale (figg. 4, 5).

Lo stesso valga per i fasci fibrillari che son costituiti dalla riunione di varî neuriti; noi sappiamo che la struttura fibrillare di quei fasci è l'esponente della struttura dei varî neuriti, i quali si raccolgono in un fascio unico (figg. *N*, *Q*).

Che le fibrille abbiano una struttura granulare, come credono W. e M. Lewis, non risulta dalle mie ricerche; molto probabilmente si tratta di artefatti, come gli Autori stessi suppongono. Questi granuli avrebbero una certa affinità per le sostanze coloranti, cosicchè resistono all'estrazione del colore più del rimanente della fibra. Forse essi rappresentano la parte colorabile della fibra (acido fibrillare?), che per effetto della fissazione si è separata dal rimanente.

Collo studio minuzioso di questi fasci fibrillari appiattiti abbiamo rilevato qualche fatto che non armonizza pienamente colle idee oggi dominanti sulle neurofibrille.

La dottrina di Àpathy presuppone, che le neurofibrille siano entità morfologiche ben definite in tutta la loro estensione, e che ciascun neurofibrilla contenga una somma determinata di fibrille elementari individualizzate; in alcune regioni le fibrille primitive si risolvono nelle fibrille elementari.

Heidenhain (1911) contro la dottrina di Àpathy porta varî argomenti; uno dei più importanti sarebbe il seguente: cilindrassi esili quanto le più sottili neurofibrille possono risolversi in un numero grandissimo di cospicui cordoni fibrillari; in tal caso una sola sottilissima neurofibrilla si scompone in un numero sterminato di filamenti.

Heidenhain spiega questi ed altri fatti colla sua ipotesi della metastruttura; una neurofibrilla istologica ha, come una miofibrilla, il valore di un istomero di un ordine di grandezza determinato, ed essa ha la proprietà di dissociarsi in un numero infinito di filamenti; esse possiedono una struttura protomerica divisibile, la quale ha il suo fondamento in un'organizzazione elementare; da questa struttura si possono costituire neurofibrille in numero infinito sia col tempo, cioè durante lo sviluppo, sia nello spazio, cioè ad una distanza determinata.

Le idee di Heidenhain sulla divisibilità indefinita delle neurofibrille trovano una conferma in alcuni dei fatti riferiti in questo lavoro; noi abbiamo già spiegato in altro capitolo come esili fibre o sottili fasci fibrillari si dividono spesso in un numero grandissimo di rami.

Ma le vedute di Heidenhain dovrebbero secondo me essere modificate nel senso, che la sostanza, la quale rappresenta il costituente principale delle fibre nervose non ha sempre necessariamente una struttura fibrillare, visibile al microscopio.

Troviamo un accenno a trasformazioni analoghe a quelle da me osservate nella pubblicazione di W. e M. Lewis; questi A. rilevano, che nei preparati di colture fissate e colorite le neurofibrille sono maggiormente evidenti nel tratto prossimale della fibra che nel distale, sebbene in quest'ultimo il diametro della fibra sia più rilevante; così se la fibra si appiattisce nel passare al disopra ad una cellula mesenchimale, le neurofibrille possono mancare.

Ingebritsen (1913) ha notato, che la struttura fibrillare ben evidente sul tragitto delle grosse fibre cresciute nel plasma, non è invece apprezzabile nei rigonfiamenti che sono intercalati sul decorso delle fibre; questi hanno un protoplasma a costituzione ialina.

Io ho rivolto particolare cura allo studio dell'intima struttura delle fibre in vitro, ricorrendo ai migliori apocromatici e variando le condizioni di illuminazione. Esaminando per qualche tempo una grossa fibra, oppure un fascio appiattito in colture viventi, talora vidi a poco a poco scomparire la struttura fibrillare, quasi che i filamenti confluissero, ma dopo qualche tempo quella struttura si rendeva nuovamente manifesta.

Queste trasformazioni interessavano tutta la lunghezza del fascio o della fibra, ma più sovente soltanto il suo tratto distale.

Guidato da quest'importante osservazione ho potuto allora spiegarmi delle imagini singolari viste nei preparati fissati. Nei fasci colorati col metodo fotografico che furono riprodotti fedelmente nelle figure 24-26 e 28, sembra a prima vista che sussistano soltanto poche neurofibrille individualizzate ed un'abbondante sostanza plasmatica interfibrillare; e che quest'ultima divenga più abbondante in determinati punti, specialmente ove i fasci e le fibre si anastomizzano (figg. 18, 24, 25, 26, 28).

Ma con un esame più accurato rileviamo, che questa sostanza che abbiamo definito come plasmatica ha talora una struttura fibrillare, per quanto poco distinta (figg. 26, 28) e che insensibilmente essa si continua nelle neurofibrille vere e proprie, dalle quali non si distingue che per una tonalità di colore un poco diversa; assai dimostrativa mi sembra particolarmente la fig. 26, ove nel punto di riunione di varie sottili fibre è intercalata una lamina protoplasmatica a forma irregolare, nella quale le fibre sembrano perdersi.

Inoltre le neurofibrille si risolvono in lamine che hanno le stesse proprietà microchimiche delle neurofibrille, e questa constatazione si accorda pienamente con quanto ci fu dato di scorgere nelle colture viventi: il divenire omogenei in momenti determinati di fasci a struttura neurofibrillare (fig. *N*).

Nelle espansioni terminali delle fibre e dei fasci troviamo delle variazioni di struttura che si succedono a brevi intervalli, le quali convalidano pienamente l'opinione che ci siamo formati sulla costituzione delle fibre nervose.

Premetto che nella letteratura troviamo pochi cenni sulla struttura delle mazze terminali. Dalle figure di Held e di Cajal si rileva che la mazza di accrescimento reagisce di fronte ai metodi elettivi per le fibrille, come il rimanente del cilindrasse; di solito appare come una massa compatta, ma vi si scorge anche qualche fibrilla divaricata dal grosso della massa fibrillare (Held).

Cajal (1907), col confronto fra preparati col metodo fotografico e con quello della reazione nera, dimostra che la mazza è costituita da due parti: l'una plasmatica colorabile col cromato d'argento, l'altra fibrillare, che da sola riempie l'asse della mazza, nello spessore della quale si perde emettendo dei filuzzi.

Burrows ha trovato, che le mazze terminali ed i loro pseudopodi si colorano irregolarmente; delle strie colorate in oscuro, passano dalla fibra nei differenti pseudopodi; la sostanza più intensamente colorabile può apparire frammentata e può essere sparsa in tutta la massa del rigonfiamento.

W. ed M. Lewis trovarono grandi varietà nella costituzione delle espansioni; spesso consistono di una porzione finamente granulare a forma di membrana, con numerosi finissimi rami che sorpassano il limite della visibilità.

Lo studio dell' intima costituzione delle espansioni terminali nella coltura vivente è difficile: si tratta di strutture delicatissime, meno refrangenti del restante della fibra e perciò non sempre ben differenziabili otticamente dai filamenti di fibrina.

Meglio si prestano, per il maggior volume, le espansioni dei fasci fibrillari. Una separazione fra parte plasmatica e fibrillare, contrariamente a quanto ritiene Cajal, non si vede nel vivente; e se talora vi si osservano delle parti di proprietà ottiche diverse, queste non sono nettamente separate; anche quando la parte centrale dell'espansione è più refrangente, essa degrada verso la periferia in una lamella tenuissima, la quale emette varî pseudopodi sottili e trasparenti e perciò visibili a fatica; si tenga conto che nelle figure riesce difficile di riprodurre delle imagini tanto tenui e delicate e che necessariamente siano costretti a schematizzare alquanto.

Del resto la figura stessa che Cajal ritrae per illustrare l'esistanza di due sostanze, plasmatica e neurofibrillare, dimostra che queste non sono nettamente separate. E lo stesso valga per la mia fig. *S*, la quale riproduce l'espansione di un fascio colorita coll'ematossilina Held.

Seguendo per qualche tempo i mutamenti delle espansioni, vediamo che la massa neurofibrillare è sottoposta a continui cambiamenti di struttura: le fibrille confluiscono in una massa protoplasmatica apparentemente omogenea (figg. *A*, *N*); dopo qualche tempo la sostanza neurofibrillare si ricondensa in filamenti. Infine anche nelle espansioni noi troviamo le variazioni strutturali che abbiamo notato sul decorso dei neuriti.

W. e M. Lewis si chiedono, se i rami esilissimi che partono dalle espansioni hanno il valore di neurofibrille, oppure di rami collaterali delle fibre, e finiscono per concludere in favore della prima supposizione. La stessa domanda mi si affacciava spesso quando avevo sott'occhio sottili rami collaterali, oppure reticoli. Ma quando ebbi maturate le mie vedute sulla struttura degli elementi nervosi, compresi che il porre il problema in questi termini è un errore.

Non è il criterio dello spessore maggiore o minore che segna la differenza fra una fibra ed una fibrilla; seguendo le idee oggi prevalenti il criterio dovrebbe essere la presenza nella fibra di un liquido plasmatico che avvolge la fibrilla, quando questa è unica, o che separa le fibrille riunite in un fascio.

Ma se al principio delle neurofibrille rigide sostituiamo quello di una sostanza neurofibrillare, a forma mutevolissima, e che spesso invade lo spazio occupato dal liquido plasmatico, mescolandosi probabilmente con questo, la distinzione fra neurofibrille e collaterali di fibre diviene praticamente irrealizzabile.

Le caratteristiche di questa « sostanza fibrillare » sono la spiccata refrangenza e l'affinità per alcune sostanze coloranti, in condizioni adeguate di fissazione e di mordenzatura, proprietà che si manifestano sempre, indipendentemente dalla sua costituzione morfologica; ed anzi Bethe (1908) ha potuto estrarre dalle fibrille un « acido fibrillare », il quale presenta le stesse elettività tintoriali delle prime.

È vero che le proprietà fisiche ed il grado di affinità per i colori della sostanza fibrillare non sono sempre identici; i filuzzi che si irradiano dalle mazze terminali, come pure i filamenti collaterali sono pallidissimi e nella coltura vivente molto meno refrangenti dei neuriti ed io spesso mi chiesi se hanno la stessa costituzione; ma conviene tener conto che questa differenza nelle proprietà ottiche dipende dalla loro sottigliezza e forse anche da lievi variazioni fisiche della sostanza neurofibrillare.

D'altra parte anche i filuzzi che partono dalle espansioni, perfino quelli che per la loro finezza non sarebbero certo visibili nella coltura vivente, reagiscono positivamente col metodo fotografico (fig. 28) ed hanno una certa affinità per l'ematossilina acida, cosicchè non abbiamo ragione di ritenere che la sostanza neurofibrillare sia estranea alla loro costituzione.

Una revisione da tale punto di vista delle trasformazioni delle neurofibrille durante la rigenerazione dei nervi potrebbe forse condurre a risultati interessanti. Alcuni dei bottoni terminali delle fibre nervose rigenerate hanno una struttura omogenea, altri sono finamente fibrillari; ed anche in questi ultimi le fibrille sono raccolte in un groviglio più compatto presso la fibra, divengono lasse più distalmente (vedi le belle figure della monografia di Perroncito). Poichè in questo caso il controllo sulla fibra vivente non è possibile, resta da vedersi, cercando di studiare attentamente queste strutture diverse, se esse sono fasi distinte della sostanza neurofibrillare o dipendono semplicemente dalla tecnica; i fatti da me osservati nelle colture in vitro mi fanno propendere per la prima supposizione.

Riassumendo, le neurofibrille non sono organuli cellulari rigidi ed immutabili, perchè noi li vediamo talora modificare profondamente la loro costituzione ed anche confluire sotto il microscopio in lamine protoplasmatiche otticamente omogenee; queste ultime possiedono le stesse proprietà delle neurofibrille, di ridurre i sali di argento e di colorarsi coi colori di anilina.

Io ho detto che questa sostanza può avere nel vivente un aspetto ialino, ma che in preparati col metodo fotografico vi si distingue a stento una struttura fibrillare, ed è probabile che non possa essere esattamente definita, perchè ci troviamo di fronte al limite segnato dal potere di risoluzione dei nostri migliori apocromatici.

Se così fosse, i fatti da me osservati si accorderebbero coll'ipotesi di Heidenhain della metastruttura delle neurofibrille, modificata nel senso, che esse non rappresentano organuli cellulari permanenti, ma che possono continuamente risolversi in fibrille più sottili e talora non visibili coi nostri mezzi ottici, cosicchè sembrano confluire in una lamina ialina; tale trasformazione sarebbe reversibile, perchè la sostanza neurofibrillare può ricondensarsi in fibrille chiaramente visibili al microscopio.

È importante, che una forma non meno mutevole delle neurofibrille hanno anche gli organuli cellulari, i quali sono un attributo costante del protoplasma, i condriosomi; questo fu dimostrato nelle cellule viventi coltivate in vitro da M. e W. Lewis (1915) e da me (1916, 2): e si aggiunga che anche le trasformazioni dei condriosomi, come quelle delle neurofibrille, sono reversibili.

Sarebbe certo interessante l'approfondire la natura di queste trasformazioni; varie supposizioni si affacciano: sono esse il risultato di uno scambio di sostanza fra fibrille e liquido interfibrillare? Oppure le fibrille modificano i loro caratteri fisici per adsorpzione di acqua dall'ambiente da parte del colloide che le costituisce? Ma lo studio dei problemi di tale natura, esorbita dai limiti imposti alla morfologia dai mezzi di indagine attuali.

Riferendomi alle recentissime ricerche di Jsaacs (1916) ritengo verosimile la seconda supposizione, la quale del resto non esclude la prima. Quest'autore ha osservato che soluzioni di gelatina, di albume d'uovo, di globulina, di glutine a varia diluizione, a seconda della concentrazione, mostrano lievi differenze nelle proprietà ottiche; tanto la perdita d'acqua che la trasformazione di un sol in un gel producono un certo aumento della refrangenza.

Un altro quesito che lasciamo aperto è il seguente: quando vediamo confluire la sostanza fibrillare in una lamina omogenea, le neurofibrille scompaiono realmente, oppure seguendo le idee di Bethe (¹), soltanto l'acido fibrillare si diffonde, mentre la parte non colorabile delle fibrille rimane immutata?

Una questione simile è stata posta per i cromosomi; se questi scompaiono veramente durante l'intercinesi, oppure se persiste un substrato acromatico, il quale rappresenta lo scheletro sul quale durante la mitosi si concentra la nucleina.

La grande labilità delle neurofibrille, che era stata supposta già in passato, ma che viene ad essere meglio dimostrata da queste ricerche, ci può spiegare perchè la struttura delle cellule nervose si presenti tanto diversa a seconda del metodo adoperato.

Lugaro, nel 1904, espresse il convincimento, che nessuna imagine corrisponde esattamente alla struttura vivente, ed i risultati dei metodi citologici debbono essere considerati sempre con rigoroso relativismo. Non si può disconoscere che debba esistere una qualche struttura preformata reticolare, ma tuttavia si deve ammettere che la sostanza conducente è plastica ed alterabile. In questa questione si toccano i limiti estremi della morfologia.

La questione dal 1904 ad oggi non ha progredito gran che e rimane negli stessi termini in cui la pose Lugaro; i risultati dei varî metodi differiscono fra loro, inquantochè le strutture messe in evidenza da alcuni di essi sono più semplici e costituite da filamenti più grossi.

Anzi le ricerche di Giulio Ascoli (1913) hanno dimostrato, che perfino nelle fibre nervosi colossali di Irudinee, nelle quali si ammetteva sino a poco tempo fa

---

(¹) Bethe è convinto che l'acido fibrillare è in grado di spostarsi anche nella fibra nervosa dell'adulto; stimolando un nervo l'affinità delle fibrille per l'acido fibrillare aumenta al catode, diminuisce all'anode.

la presenza di fibrille nettamente individualizzate, con metodi opportuni si distinguono dei reticoli finissimi, i quali verso il centro si riuniscono in cordoni di fibrille.

Alcuni autori hanno spinto il loro scetticismo sino a mettere in dubbio la preesistenza delle neurofibrille nel vivente, ed hanno tentato di dimostrare, che esse sono semplicemente un prodotto di precipitazione provocato dai fissatori. Ed è doveroso di riconoscere che fino ad oggi le neurofibrille non erano state viste negli elementi nervosi non fissati.

La struttura fibrillare vista a fresco da Max Schultze nelle fibre dell'olfattorio, non è dovuta alla presenza di neurofibrille, bensì di sottili cilindrassi, come Tuckett rileva. Parimenti tutte le osservazioni successive sulla struttura fibrillare delle cellule e delle fibre nervose non reggono alla critica. Held in nervi di larve di anfibî viventi non potè distinguere delle neurofibrille.

Alcuni autori hanno insistito sulla rassomiglianza fra le neurofibrille e le strutture che si hanno in soluzioni colloidali coagulate dai fissatori istologici (Pighini (1909), Leca Marcho).

Auerbach (1912) dai suoi studî sulla struttura delle fibre dell'ischiatico di rana conclude, che con la coagulazione di un plasma originariamente omogeneo si può ottenere una struttura filamentosa e che la preesistenza delle neurofibrille nel vivente non è dimostrata.

Lugaro (1909) ha sottoposto il tessuto nervoso ad una coagulazione rapida col calore e successivamente lo ha trattato coi metodi elettivi per le neurofibrille ottenendo un risultato positivo. Secondo Lugaro in questo caso le neurofibrille non possono essere un prodotto della precipitazione da parte dei fissatori, perchè tale azione precipitante non potrebbe esercitarsi su colloidi coagulati, e d'altra parte, l'A. ritiene inverosimile che la coagulazione da calore produca gli stessi effetti dei fissatori.

Quest'argomento addotto da Lugaro in favore della preesistenza delle neurofibrille non è privo di valore, ma non può essere considerato decisivo, finchè non sarà provato che l'azione precipitante dei fissatori non possa ottenersi anche su colloidi coagulati dal calore.

Col metodo delle colture dei tessuti il problema fu risolto in senso affermativo; ma nello stesso tempo viene ad essere provato, che almeno nelle fibre in via di sviluppo le neurofibrille sono straordinariamente labili e di forma mutevole e che possono perfino confluire in masse omogenee.

È evidente che di tutto ciò bisogna tener conto nell'intepretazione delle strutture delle cellule e delle fibre nervose dell'adulto.

Da un lato è prevedibile che la sostanza neurofibrillare possa subire variazioni funzionali di forma; l'ipertrofia delle neurofibrille nei rettili ibernanti (Tello), la trasformazione del reticolo in grossi fasci colorabili elettivamente, illustrata da Donaggio (1906) nel coniglio per l'azione combinata del digiuno e del freddo, e varî fatti avevano lasciato da tempo pensare, che la forma del reticolo neurofibrillare della cellula nervosa adulta sia suscettibile di modificarsi anche nei limiti della funzione normale (¹).

(¹) Marinesco (1915) critica l'ipotesi di Goldschmidt, che le neurofibrille abbiano il valore di uno scheletro rigido regolatore della forma della cellula nervosa, ed esprime la convinzione che esse siano organi plastici.

D'altro canto la grande labilità della sostanza neurofibrillare spiega le grandissime variazioni nella forma del reticolo in cellule dello stesso tipo per l'azione di reattivi precipitanti diversi.

Per quel che riguarda le fibre embrionali in vitro, perchè a queste si limitarono le nostre osservazioni, la struttura visibile nel vivente è di gran lunga più fine di quella che si ottiene col metodo fotografico, e si avvicina piuttosto all'imagine che ci offre il metodo Donaggio; cosicchè io trassi dai miei studî la convinzione, che la fissazione in alcool determina certamente in molti casi la conglutinazione di gruppi di sottili fibrille in cordoncini, che si colorano uniformemente coll'argento.

VII.

Riassunto.

1. Nelle colture di tessuto nervoso embrionale le fibre crescono isolate e restano indipendenti quando il tessuto fu coltivato in un coagulo denso e spesso. In altre colture i cilindrassi ed i loro rami si anastomizzano. Le connessioni avvengono per sottili rami collaterali, che possono però presto scomparire; oppure rami più grossi si uniscono per breve tempo, poi si liberano e continuano a crescere. Od infine le connessioni divengono definitive e la complicazione delle reti che si vanno formando va diventando maggiore con l'età della coltura.

Reti a sottili fibre ed a strette maglie si differenziano anche da vacuoli scavati nello spessore dei neuriti, i quali aumentano di estensione, divaricano fortemente i fascetti di fibrille del neurite e ne determinano l'assottigliamento.

Da tale punto di vista il comportamento dei neuroni che crescono in vitro ha un'analogia sensibile con quello delle cellule mesenchimali, le quali nelle colture si uniscono sovente in sincizi, ma non di rado singole cellule si liberano dal sincizio e riacquistano la propria indipendenza.

Questo particolare ha un valore non lieve per la dottrina generale della struttura del tessuto nervoso, perchè ci dimostra, che anche quando i prolungamenti di varî neuroblasti si sono fra loro anastomizzati in una rete, l'individualità anatomica dei neuroni è bensì scomparsa, ma abbiamo ragione di ritenere che una parte del protoplasma nervoso rappresentato dal neurite e dalle sue collaterali, il quale si trova sotto la dipendenza del neuroblasta, per oscure affinità biologiche mantenga con quest'ultimo dei rapporti funzionali più intimi, dimodochè ad un certo momento possa rendersi un'altra volta indipendente.

2. I neuriti di varî neuroblasti possono convergere in un fascio a forma di lamina sottile ed a struttura finissimamente fibrillare; struttura che è l'esponente della costituzione fibrillare dei singoli neuriti, resasi manifesta per effetto della distensione del fascio in una lamina. Quest'appiattimento dei cordoni di fibre si nota nelle colture a coagulo sottile e poco denso e si può spiegare coll'ipotesi di Harrison dello stereotropismo. Essi si adattano ad un mezzo meno favorevole al loro accrescimento,

assumendo una forma che ne facilita l'adesione alla faccia inferiore del vetrino, oppure alla superficie del coagulo. Questi fasci crescono per movimento ameboide dell'estremo distale, quasi che rappresentino un'unica fibra molto ingrandita, e che l'individualità dei varî neuriti sia scomparsa. È difficile di decidere se così sia realmente, ma certo fra i neuriti di ciascun fascio avviene uno scambio di sostanza ed il fascio cresce per movimento ameboide del suo estremo distale, quasi che esso sia una massa fibrillare unitaria.

3. I fasci si ramificano secondo il tipo dicotomico o monopodico, oppure si risolvono in numerosissime fibre sottili; ed i rami provenienti da uno stesso fascio, oppure da fasci distinti si anastomizzano, risultandone delle reti complesse. Sottili fibre possono anche ricostituirsi in un cordone, che dopo un certo tratto si risolve di nuovo in filamenti sottili.

Delle reti a maglie strette si possono anche formare per la comparsa di liquido nello spessore dei cordoni, il quale aumentando rapidamente in quantità divarica i fascetti di fibrille.

Infine in qualche caso le anastomosi fra i fasci fibrillari si stabiliscono nell'interno del tessuto ed allora vediamo apparire nel coagulo un reticolato a grosse trabecole fibrillari, senza che sia stato possibile di definire l'origine di tali anastomosi.

Io mi astengo deliberatamente da qualsiasi raffronto fra i fenomeni da me studiati e quelli che si svolgono durante la differenziazione del tessuto nervoso dell'embrione. Conviene tener presente la premessa che ho formulato nell'introduzione di questo lavoro: che con la tecnica attuale non ci è concesso di riprodurre in vitro il tessuto nervoso, ma possiamo soltanto studiare determinate proprietà degli elementi nervosi.

Una proprietà che risulta dalle presenti ricerche è la tendenza da parte dei neuriti a conglutinarsi; anche se nell'embrione per le condizioni diverse nelle quali si svolge lo sviluppo delle fibre nervose, questa conglutinazione non avviene sempre, è possibile che la formazione di molti plessi e reti nervose dipenda da tale proprietà. Ci riferiamo specialmente alle reti fra i neuroblasti dei ganglî descritte da Held in embrioni precoci di anitra e delle quali non si trova traccia in fasi successive. Forse in tal caso si tratta di reti transitorie simili a quelle da me viste nelle colture.

Ma neppure l'esistenza di reti nervose nell'organismo a completo sviluppo di Vertebrati e di Invertebrati può essere oggi più messa in dubbio.

4. Singoli neuroblasti possono liberarsi dal tessuto ed emigrare nel plasma, senza che per questo la loro vitalità e la potenzialità di formare il neurite venga compromessa; ma per questo è condizione indispensabile che il neuroblasta resti unito con uno o più filamenti agli elementi del tessuto. I neuroblasti del tutto isolati sono irremissibilmente destinati a regredire dopo breve tempo.

5. Il costituente essenziale dei neuroni è una sostanza specifica, che non ha il suo riscontro in altre cellule e che ha la tendenza a disporsi in filamenti microscopici, le neurofibrille. Tale struttura non è il prodotto di una precipitazione da parte dei liquidi fissatori, ma esiste realmente anche nelle fibre nervose viventi.

Essa però non è visibile finchè la fibra mantiene una forma cilindrica, perchè la sostanza interfibrillare è tanto scarsa, che le fibrille sovrapposte in varî piani non possono essere differenziate otticamente. Però quando le fibre od i cordoni di fibre si espandono sulla faccia inferiore del vetrino in sottili lamine, le fibrille si dissociano alquanto e divengono manifeste.

Ma seguendo sotto il microscopio le trasformazioni che avvengono nell'intima struttura delle fibre in via di sviluppo, noi abbiamo veduto, che, contrariamente a quanto era generalmente ammesso fino ad oggi, le neurofibrille non sono organuli cellulari costantemente individualizzati e permanenti, ma mutevolissimi.

Noi le abbiamo vedute risolversi in fibrille tanto sottili da essere a stento visibili, e perfino confondersi in lamine protoplasmatiche apparentemente omogenee, nelle quali più tardi può rendersi di nuovo manifesta una struttura fibrillare. Tali trasformazioni sono più frequenti e meglio apprezzabili nella regione di massima attività delle fibre o dei fasci, cioè in corrispondenza della loro espansione terminale.

VIII.

Indicazioni bibliografiche.

Ascoli G. (1913). *Zur Kenntniss der neurofibrillären Apparates der Hirudineen.* Arch. f. mikr. Anat., Bd. 82.

Auerbach L. (1912). *Die Beziehungen zwischen dem Strukturbilde des Axencylinders der markhaltigen Nerven der Wirbeltiere und den physikalischen Bedingungen der Fixation.* Arch. f. mikr. Anat.. Bd. 81.

Bethe A. (1903). *Allgemeine Anatomie und Physiologie der Nervensystems.* G. Thieme, Leipzig.

Braus H. (1911). *Die Entstehung der Nervenbahnen.* Verh. der Ges. Deutscher Naturforscher und Aertze.

Burrows Montrose T. (1911). *The growth of tissues of the chick embryo outside the animal body with special reference to the nervous system.* Journ. of exp. Zool., vol. 10.

— (1912). *Grafting of normal tissues as dependent on zoological or individual affinity.* Publ. of Cornell Univ. med. College. Studies from the depart. of Anat., vol. 4.

Cajal S. (1907). *Die histogenetischen Beweise der Neuronentheorie von His und Forel.* Anat. Anz., Bd. 30.

— (1910). *Algunos experimentos de conservation y autolisis del tejido nervios.* Trabajos del Lab. de Inv. biol. de la Univ. de Madrid, T. 8.

Donaggio A. (1906). *Effetti dell'azione combinata del digiuno e del freddo sui centri nervosi di Mammiferi adulti.* Riv. sper. di Fren., vol. 32.

Harrison R. G. (1909). *The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement.* Journ. of exp. Zool., vol. 9.

— (1911). *On the stereotropism of embryonic cells.* Science, vol. 34.

— (1912). *The cultivation of tissues in extraneous media as a method of morphogenetic study.* Anat. Record, vol. 6.

— (1913). *Life of tissues outside the organism from the embryological standpoint.* Trans. of the Congr. of amer. phys. and surgeon, 9° Session.

Held H. (1909). *Die Entwicklung des Nervengewebes bei den Wirbelthieren.* A. Barth, Leipzig.

Heidenhain M. (1911). *Plasma und Zelle.* 2° Lief. *Die kontraktile Substanz* etc. G. Fischer, Jena.

Hertwig O. (1912). *Methoden und Versuche zur Erforschung der Vita propria abgetrennter Gewebs- und Organ-Stückchen von Wirbelthieren.* Arch. f. mikr. Anat. Bd. 79.

Ingebritsen (1913). *Studies on the degeneration and reintegration of axis cylindres in vitro.* Journ. of exp. Med., vol. 17.

Isaacs R. (1916). *Properties of colloids in relation to tissue structure.* Anat. Record, vol. 10.

Kappers Ariens. (1913). *Phenomena of neurobiotaxis in the central nervous system.* Rep. of the 17 Intern. Congress of Med. London, (in questa pubblicazione sono riassunte le idee espresse dall'A. in varie altre Memorie antecedenti).

Legendre R. e Minot H. (1910). *Essais de conservation hors de l'organisme des cellules nerveuses des ganglions spinaux.* Comptes rendus de la Soc. de Biol., T. 88, Séance du 7 Mai 1910.

— (1911). *Formation de nouveaux prolongements par certaines cellules nerveuses* etc. Ibidem, 7 Janvier 1911, T. 70.

Levi G. (1916, 1). *Sull'origine delle reti nervose nelle colture di tessuti.* Rendic. della R. Accad. dei Lincei, Cl. di Sc. fis. ecc., vol. 25, Serie 5ª.

— (1916, 2). *La costituzione del protoplasma studiata su cellule viventi coltivate in vitro.* Arch. di Fisiol., vol. 14.

— (1916, 3). *Differenziazione « in vitro » di fibre da cellule mesenchimali e loro accrescimento per movimento ameboide.* Monit. zool. ital., Anno 27.

Lewis W. H. e Lewis M. R. (1912). *The cultivation of sympathetic nerves from the intestine of chick embryos in saline solutions.* Anat. Record, vol. 6.

— (1915). *Mitochondria in tissues cultures.* Amer. Journ. of Anat., vol. 17.

Lugaro E. (1904). *Sui metodi di dimostrazione delle neurofibrille.* Atti del 12° Congresso della Soc. Fren. ital., Genova, 18-22 ottobre 1904.

— (1909). *Una prova dell'esistenza delle neurofibrille nel vivente.* Riv. di Pat. nerv. e mentale, vol. 14.

— (1910). *Ancora intorno all'esistenza delle neurofibrille nel vivente* Ibidem, vol. 15.

Marinesco e Minea (1912). *Culture des gaglions spinaux des Mammifères « in vitro » suivant le procedé de Carrel.* Acad. de Mèdicine, Séance du 9 Juillet 1912.

— (1915). *Sur la nature des neurofibrilles.* C. r. de la Soc. de Biol. T. 77.

Perroncito A. (1908). *La rigenerazione dei nervi.* Mem. del R. Ist. Lomb. di Scienze e Lettere, vol. 20, F. 10.

Pighini G. (1909). *Sulle precipitazioni della sostanza nervosa sotto forma reticolare.* Riv. sper. di Fren., vol. 35.

Sanguinetti L. R. (1914). *Influenza delle sostanze nervine sull'accrescimento dei nervi in vitro.* Riv. di Pat. nerv. e mentale, vol. 19.

IX.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE

(Tutte le figure furono riprodotte fedelmente coll'apparecchio da disegno Zeiss).

Fig. 1. — Da una coltura di lobo ottico di embrione di pollo al 7° giorno fissata alla 48ª ora; fu riprodotto un solo piano di fibre per non complicare troppo la figura. Zenker. Ematossilina molibdica di Held. Ingrandimento 280 ×

Fig. 2. — Da una coltura di rombencefalo di un embrione di pollo di 3 giorni e 5 ore, fissata alla 45ª ora in Zenker; colorazione come sopra (Coltura 14 *J*). Plesso formato dai neuriti di due neuroblasti. Ingr. 280 ×

Fig. 3. — Dalla stessa coltura della fig. 2 (14 *J*). In *A* anastomosi fra i neuriti di due neuroblasti; in *B* i neuriti di due altri neuroblasti procedono accollati per lungo tratto (0,6 mm.) e poi formano un plesso che fu riprodotto soltanto in parte nella figura. Ingr. 800 ×

Figg. 4 e 5. — Da una coltura di rombencefalo di un embrione di 3 giorni e 6 ore, fissata alla 48ª ora in liquido Maximow. Ematossilina Held (21 *S*). Neuriti di neuroblasti emigrati che si espandono in lamine; queste si riuniscono in fasci fibrillari appiattiti. Ingr. 800 ×

Fig. 6. — Cordone a forma cilindrica costituito da neuriti individualizzati; questo cordone è sovrapposto ad uno strato di cellule mesenchimali, delle quali soltanto alcune furono riprodotte nella figura. Dalla coltura 14 *Q*. Metodo fotografico. Ingr. 1750 ×

Fig. 7. — Dalla stessa coltura delle figure 4 e 5 (21 *S*). I neuriti si espandono in lamine e si anastomizzano a plesso. Ingr. 540 ×

Fig. 8. — Espansione di un fascio fibrillare di 70 μ di lunghezza. Da una coltura di un embrione di 4 giorni e 6 ore, fissata alla 22ª ora in Zenker. Ematossilina Held (13 *E*). Ingr. 1750 ×

Fig. 9. — Espansione come nella figura precedente; lunghezza del fascio fibrillare 0,1 mm. La fibra *a* si separa dal tratto distale del fascio, si appiattisce, si dissocia in fibrille e termina con una larga espansione. Dalla stessa coltura della fig. 8 (13 *E*). Ingr. 1750 ×

Fig. 10. — Fascio fibrillare di 40 μ di lunghezza che si biforca in due tronchi, i quali terminano con mazze irregolari. Anastomosi fra i tronchi e le mazze terminali. Da una coltura di un embrione di 3 giorni e 5 ore, fissata alla 54ª ora in Zenker (14 *N*). Ematossilina Held. Ingr. 1750 ×

Fig. 11. — *d*, espansione terminale di un grosso fascio; da questo parte un fascetto che si ramifica. *b c*, espansione di un fascio fibrillare più sottile. Da una coltura di rombencefalo di un embrione di 3 giorni e 6 ore, fissata alla 45ª ora in Max. Ematossilina molibdica (21 *Q*). Ingr. 1750 ×

Fig. 12. — Grosso fascio fibrillare che si divide in fascetti ed in fibre sottili alla distanza di 0,14 mm. dal margine del pezzo. Da una coltura di rombencefalo di 3 giorni e 5 ore, fissata alla 29ª ora in Zenker (14 *A*). Colorazione come sopra. Ingr. 800 ×

Fig. 13. — Plesso intricato costituito da sottili fibre e da fasci fibrillari. Dalla stessa coltura della fig. 12 (14 *A*). Ingr. 800 ×

Fig. 14. — Grosso tronco che lungo il suo tragitto dà molti rami; nel tratto prossimale (in *b*) complicate anastomosi fra il tronco principale ed i rami. Varî sottili rami si ricongiungono in un tronchicino *a* e da questo partono di nuovo varî filamenti. Dalla stessa coltura della fig. 8 (13 *E*). Ingr. 800 ×

Fig. 15. — Fascio che si dissocia poco dopo la sua emergenza dal pezzo (alla distanza di 45 μ) in numerosi fascetti divergenti e questi si risolvono in fibre sottili. Da una coltura di midollo di un embrione di 4 giorni ed 8 ore, fissata alla 44ª ora in Zenker. Colorazione come sopra. (6 *D*). Ingr. 350 ×

Fig. 16. — Fascetto fibrillare proveniente dalla convergenza di 4 neuriti, che mantiene la sua individualità per lungo tratto (0,7 mm.); i suoi rami collaterali formano colle loro anastomosi delle larghe maglie. Da una coltura di rombencefalo di un embrione di 3 giorni e 5 ore, fissata in alcool ammoniacale alla 51ª ora e trattata col metodo fotografico di Cajal (14 *Q*). Ingr. 280 ×

Fig. 17. — Arborizzazioni formate dai fascetti fibrillari *a*, *b*, *c* ciascuno dei quali si costituisce per la riunione di varî neuriti; nel tratto prossimale qualche neuroblasta emigrato. Qualche anastomosi. Dalla stessa coltura 14 *Q* della fig. 16. Ingr. 280 ×

Fig. 18. — È riprodotto il tratto distale del plesso formato dai rami del fascio *c* della fig. 17. Ingr. 670 ×

Fig. 19. — Un grosso fascio, *a* che dopo essersi diviso si ricostituisce, si assottiglia gradatamente e termina con un'espansione. Reti a sottili fibre ed a strette maglie. Da una coltura di rombencefalo di un embrione di 3 giorni e 7 ore, fissata alla 53ª ora in Zenker (11 *S*), colorita con ematossilina molibdica. Ingr. 450 ×

Fig. 20. — Grossi fasci fibrillari e neuroblasti emigrati; i fasci sono uniti da anastomosi; le fibrille del fascio *A* formano una fitta rete a strette maglie *b*, dalla quale parte il fascetto *c*; questo fu riprodotto ingrandito a fig. *S*. Dalla stessa coltura della fig. 19 (11 *S*). Ingr. 420 ×

Fig. 21. — Grossi fasci fibrillari fra loro anastomizzati; rete a strette maglie formata da fibrille finissime. Dalla stessa coltura della fig. 10 (14 *N*). Ingr. 660 ×

Fig. 22. — Plesso intricatissimo formato da fascetti e da sottili fibre isolate. Da una coltura di romboencefalo di un embrione di 6 giorni e mezzo, fissata alla 31ª ora in Zenker (19 *B*), colorata come sopra. Ingr. 800 ×

Fig. 23. — Tratto distale del fascetto riprodotto a fig. 16, nel punto della sua divisione terminale (14 *Q*) riprodotto a forte ingrandimento. Ingr. 1880 ×.

Fig. 24. — Anastomosi nel punto *x* della fig. 17 (coltura 14 *Q*) molto ingrandita. Ingr. 1880 ×

Fig. 25. — Anastomosi fra i rami di divisione di un fascetto (coltura 14 *Q*). Ingr. 1880 ×

Fig. 26. — Anastomosi fra sottili fibre. La fibra *a* si espande in una lamina protoplasmatica sottilissima. Ingr. 1880 ×

Fig. 27. — Espansioni terminali di fibre; in *b* le fibrille si anastomizzano a rete; in *c* un pennacchio di fibrille esilissime. Dalla coltura 14 *Q*. Ingr. 1880 ×

Fig. 28. — Espansione terminale di un fascetto; in *a* un pennello di filamenti esilissimi, poco colorabili. Ingr. 860 ×

Dall'Istituto anatomico della R. Università di Palermo.

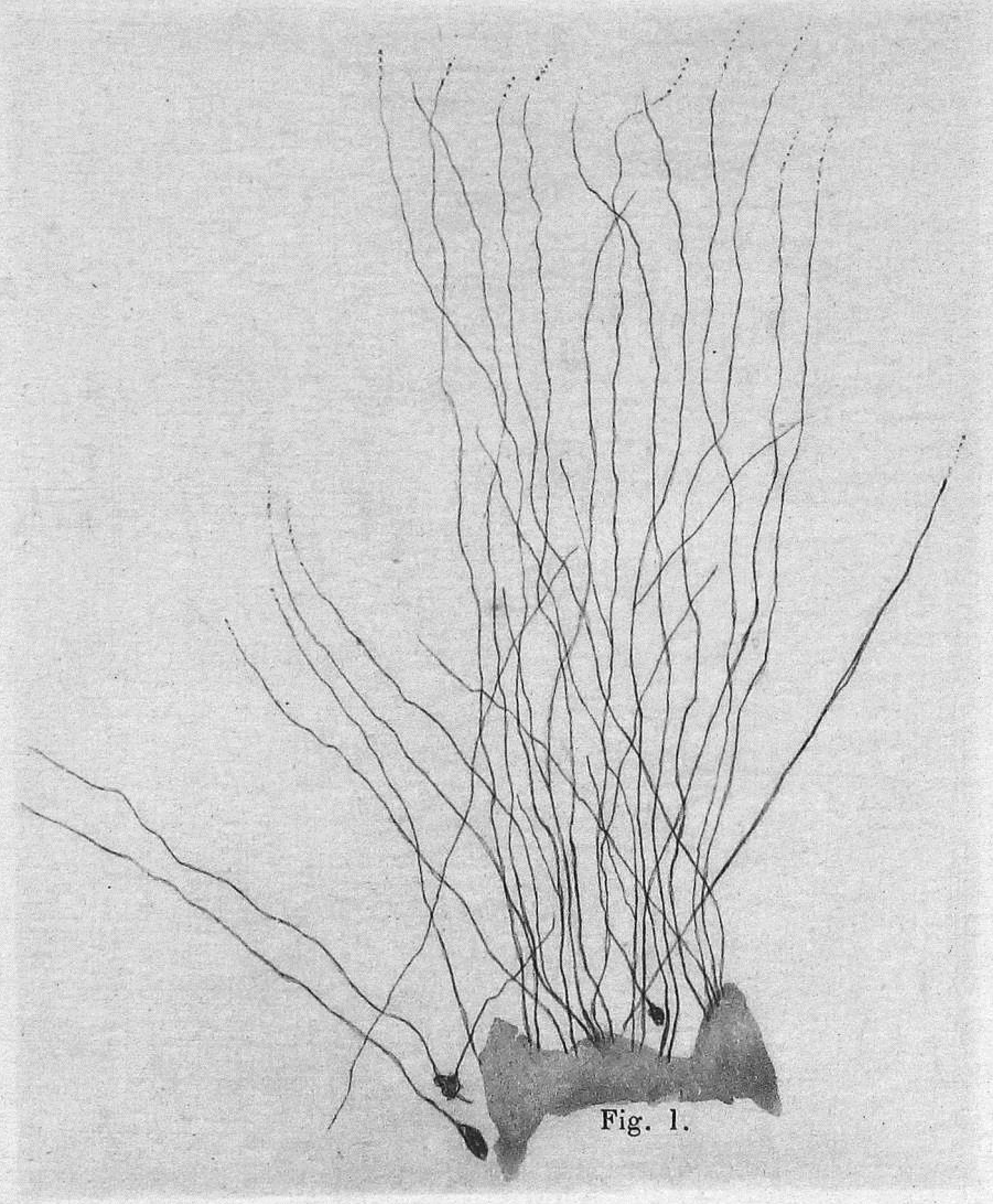


Fig. 1.

LEVI, *del.*

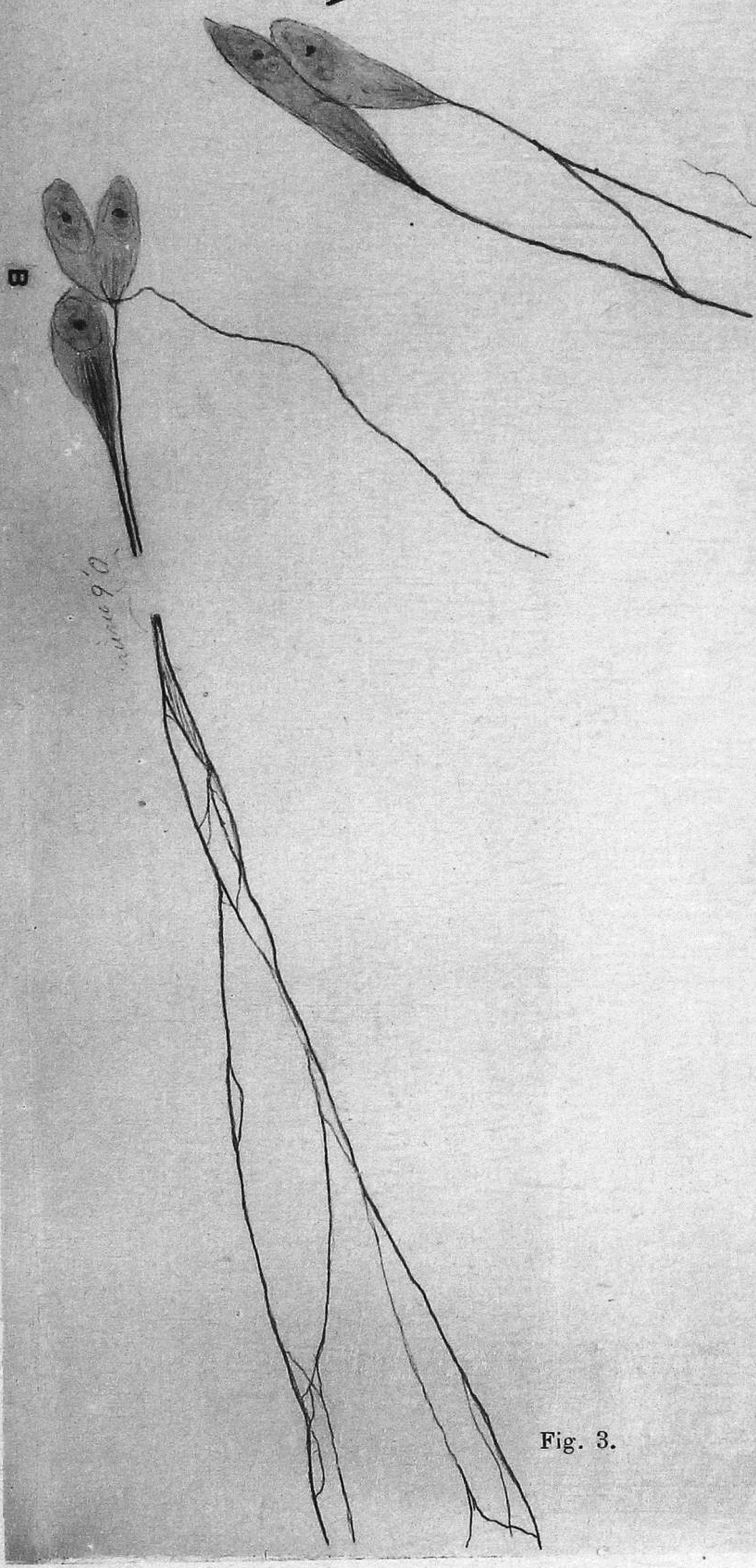


Fig. 3.

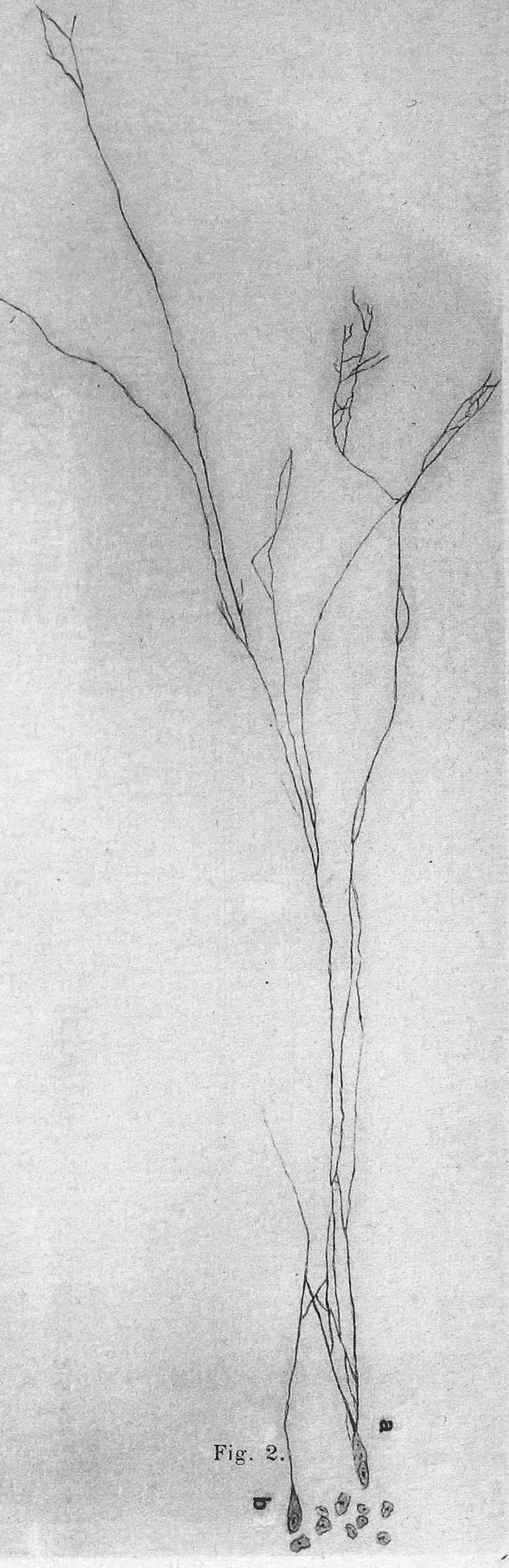


Fig. 2.

Levi, *del.*

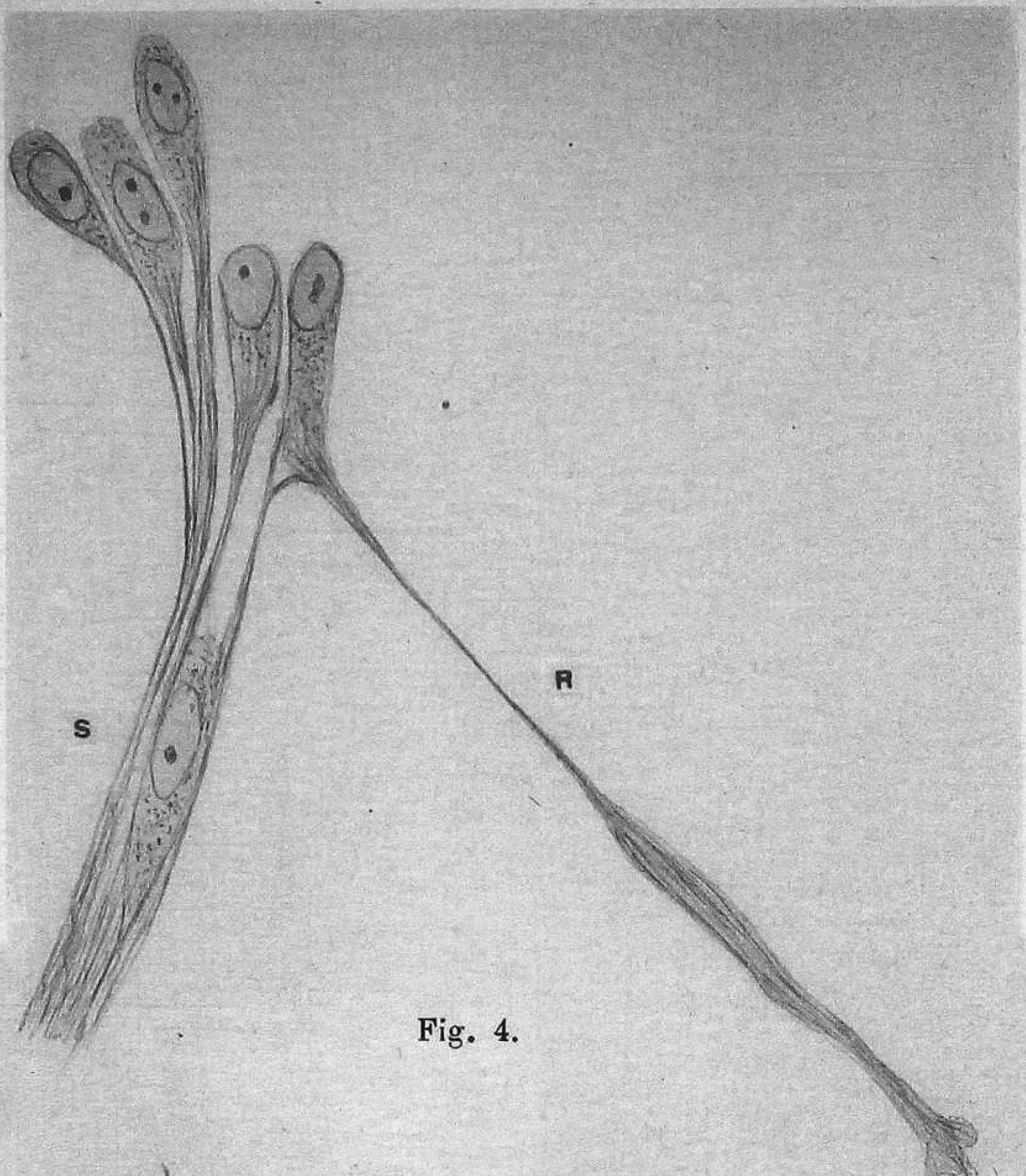


Fig. 4.

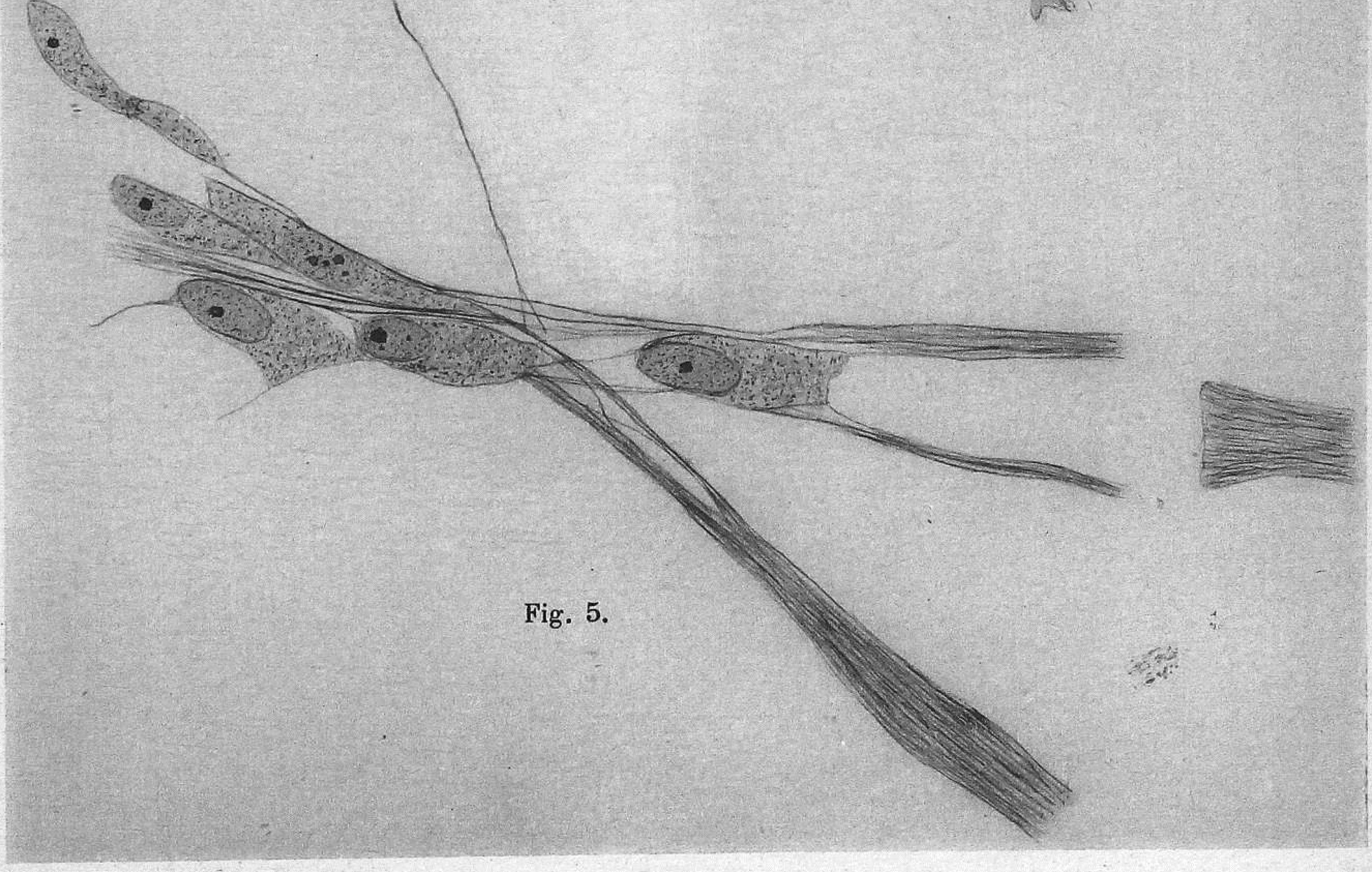


Fig. 5.

LEVI, *del.*

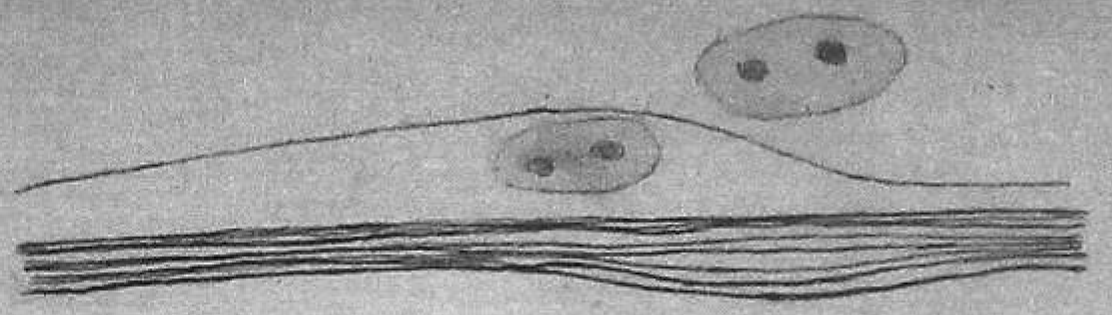


Fig. 6.

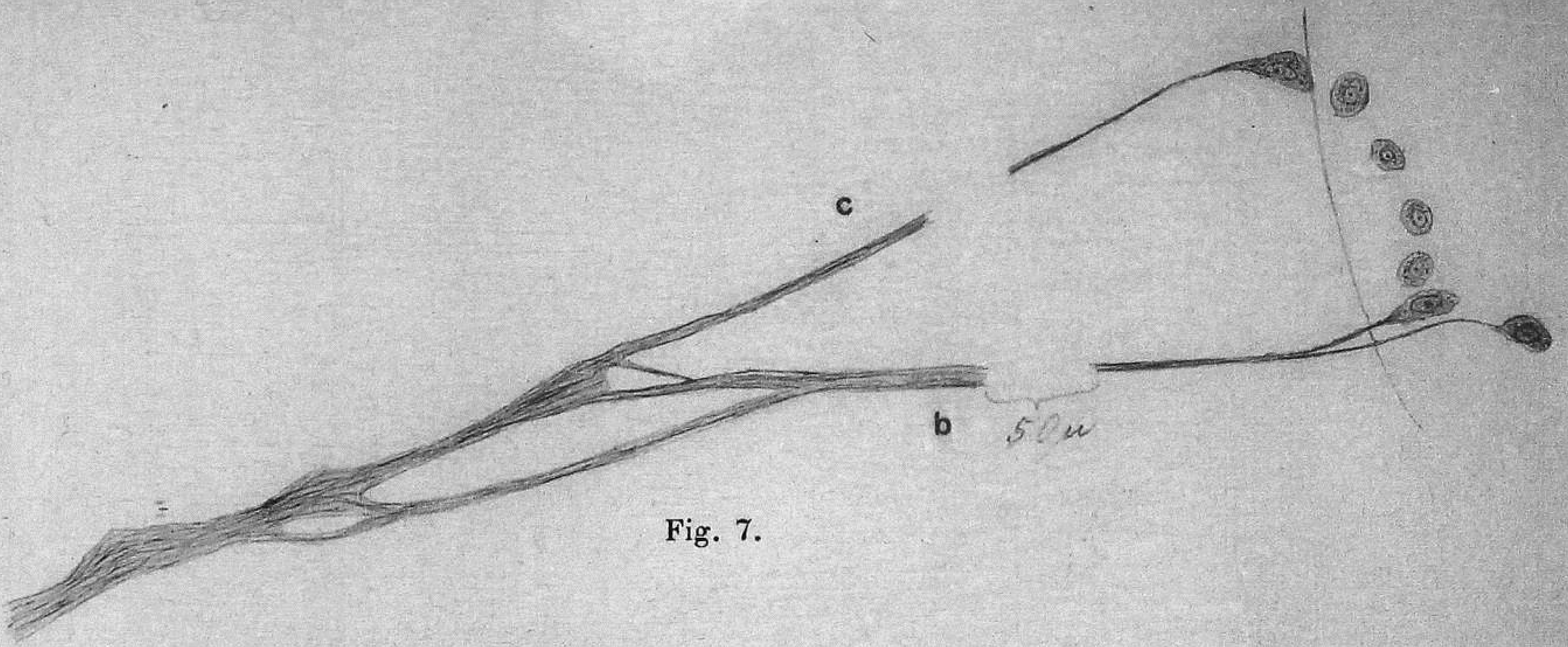
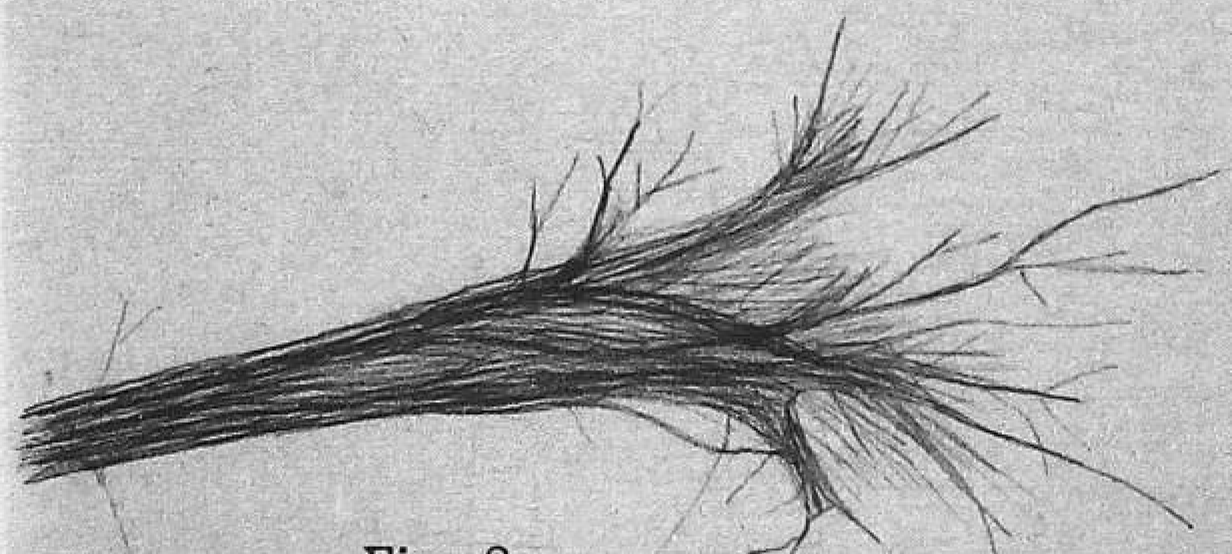


Fig. 7.



Levi, *del.*

Fig. 8.

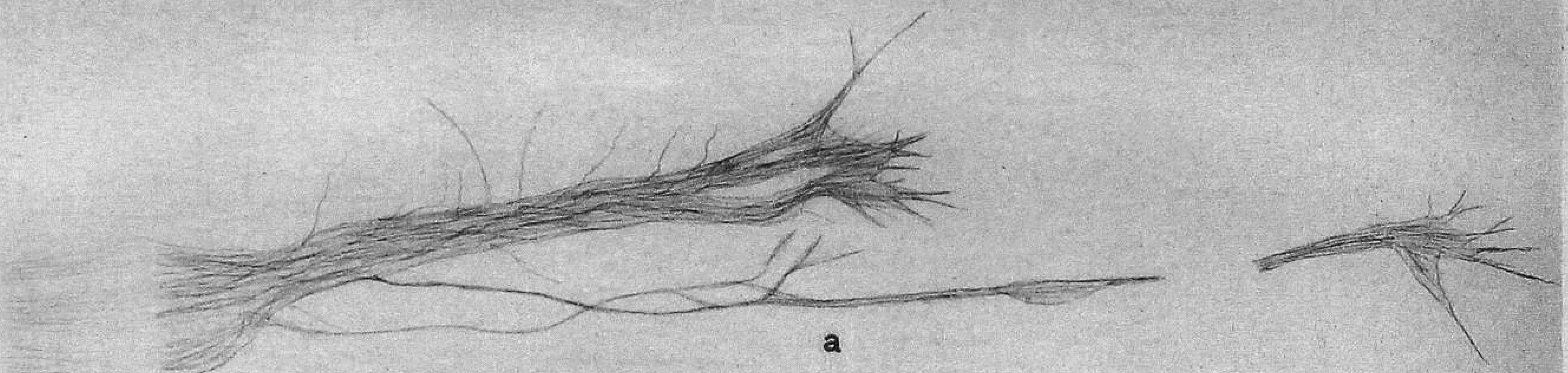


Fig. 9.

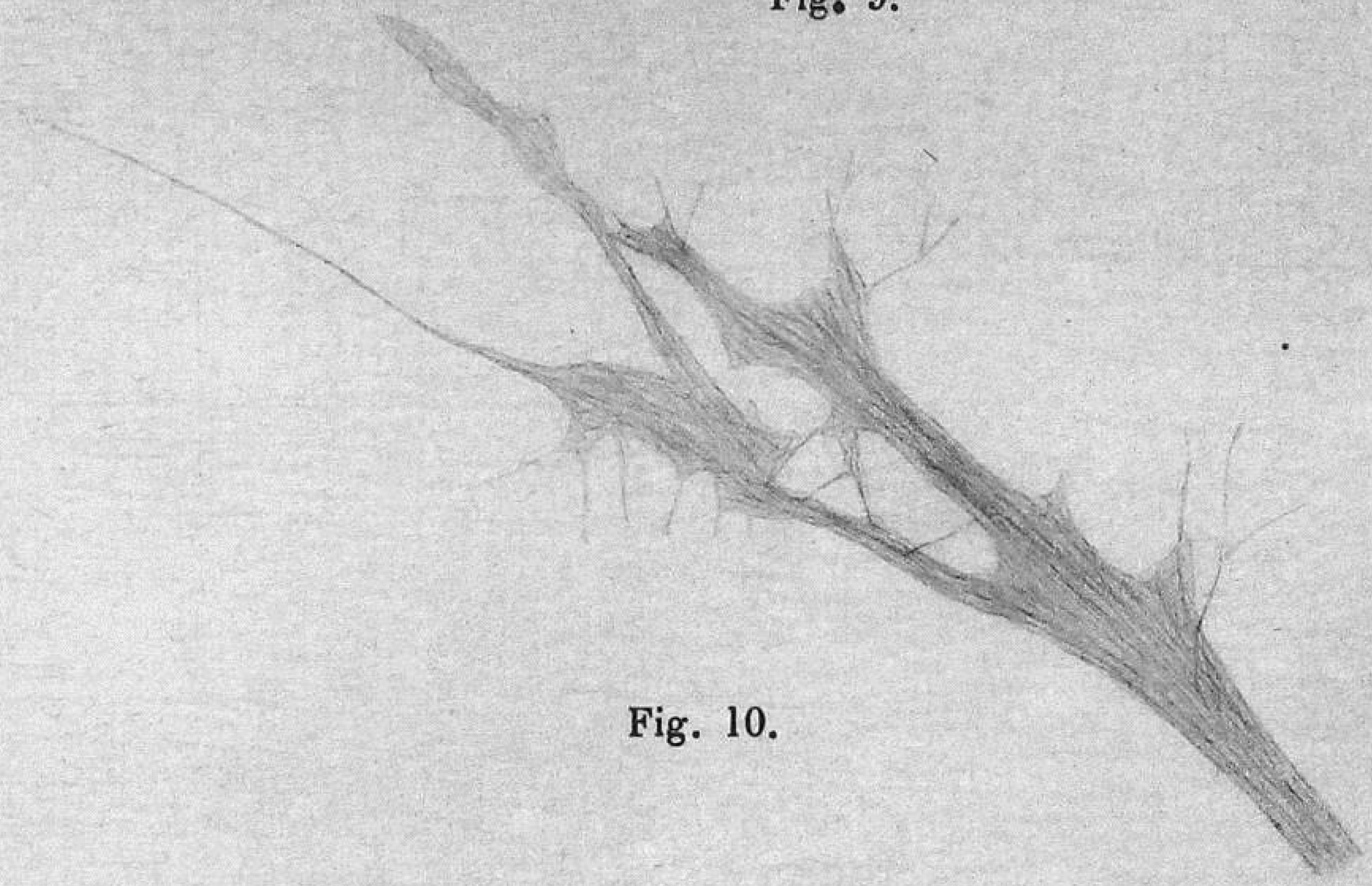


Fig. 10.

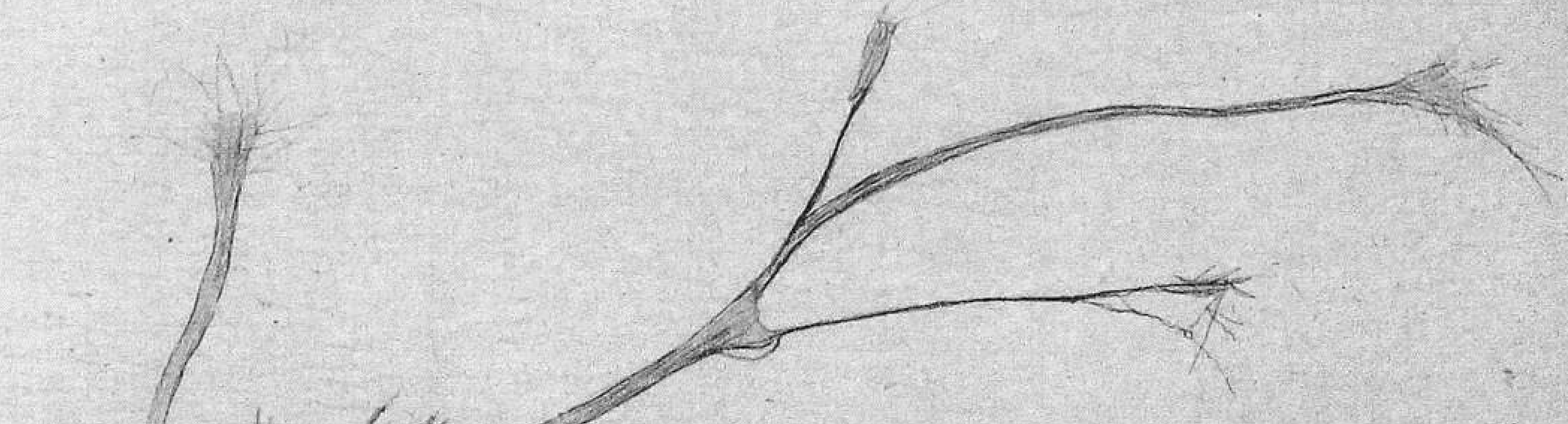


Fig. 11.

Levi, *del.*

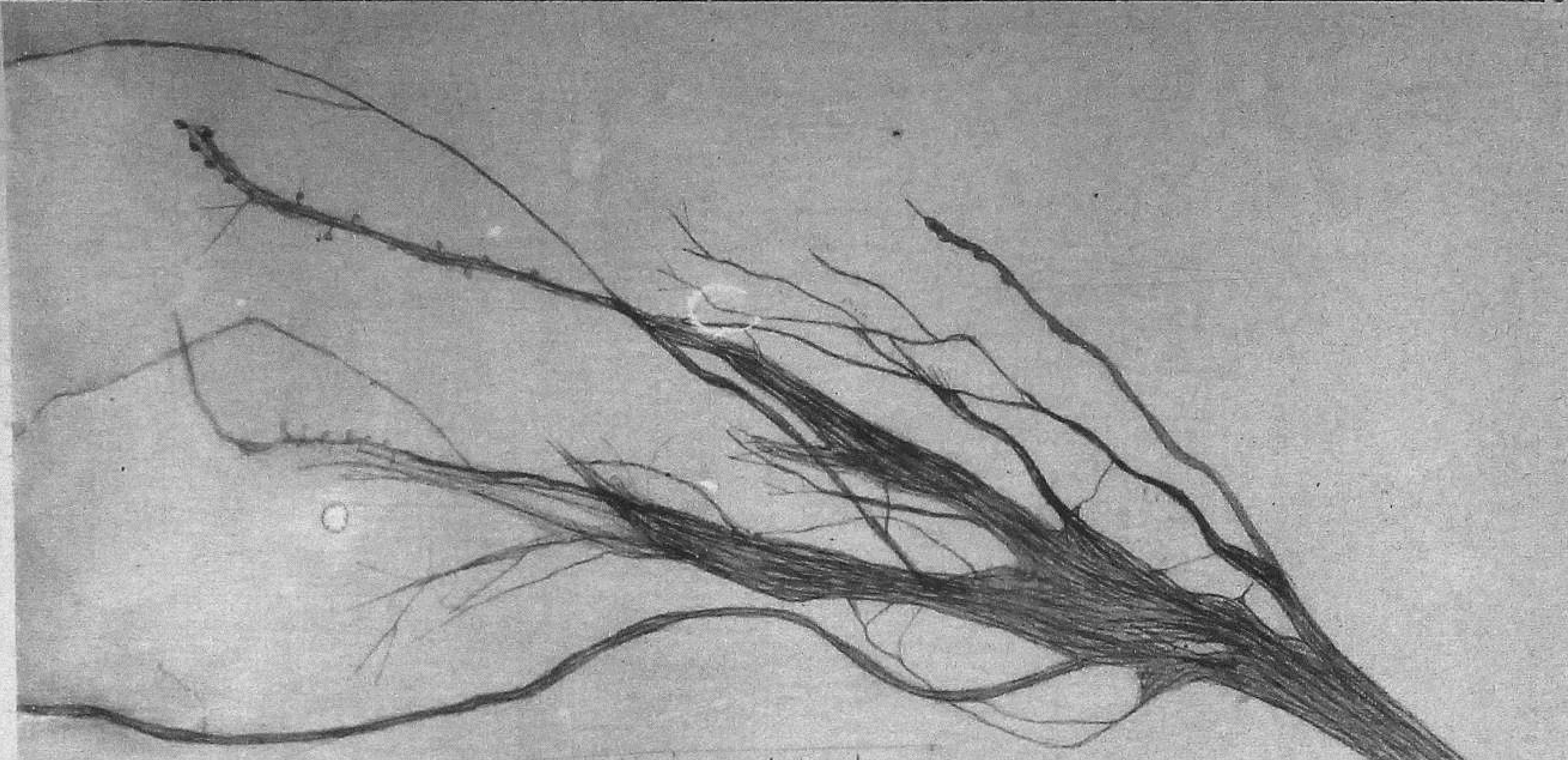


Fig. 12.

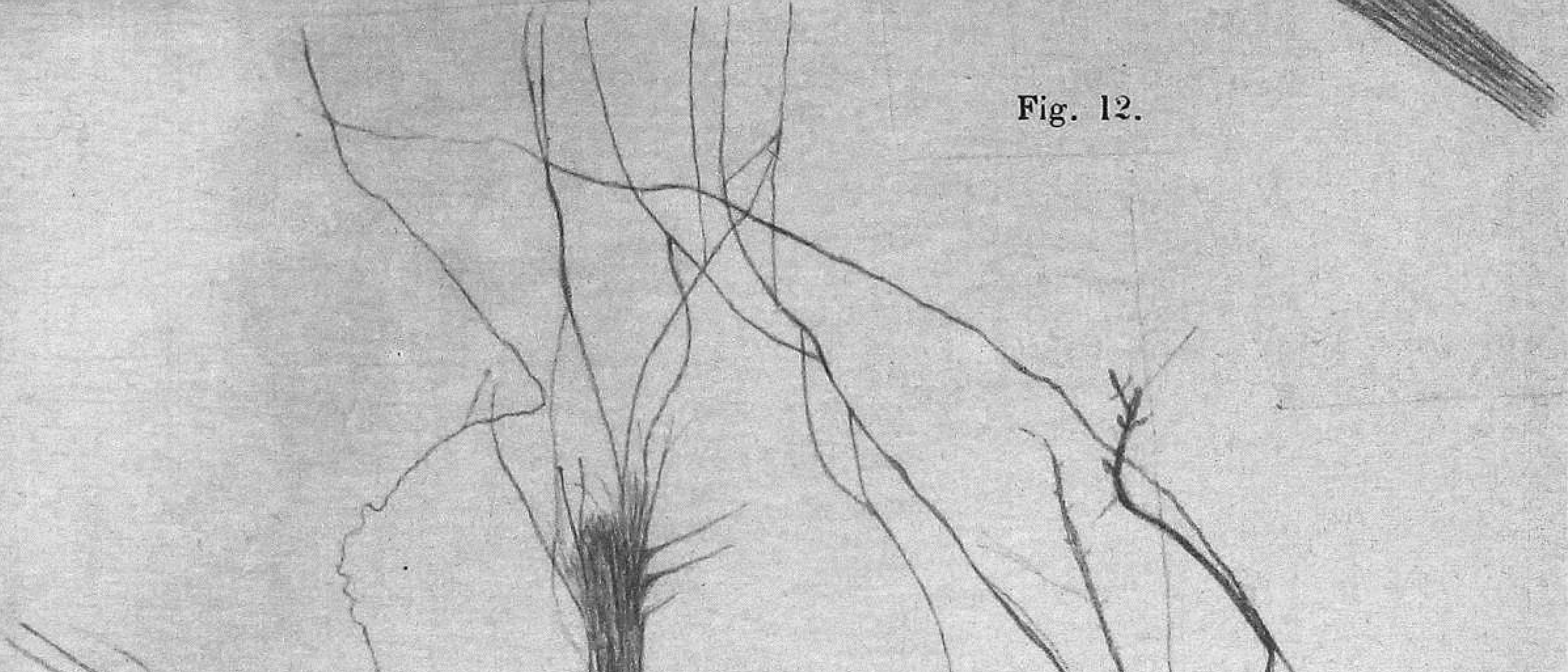


Fig. 13.

Levi, *del.*

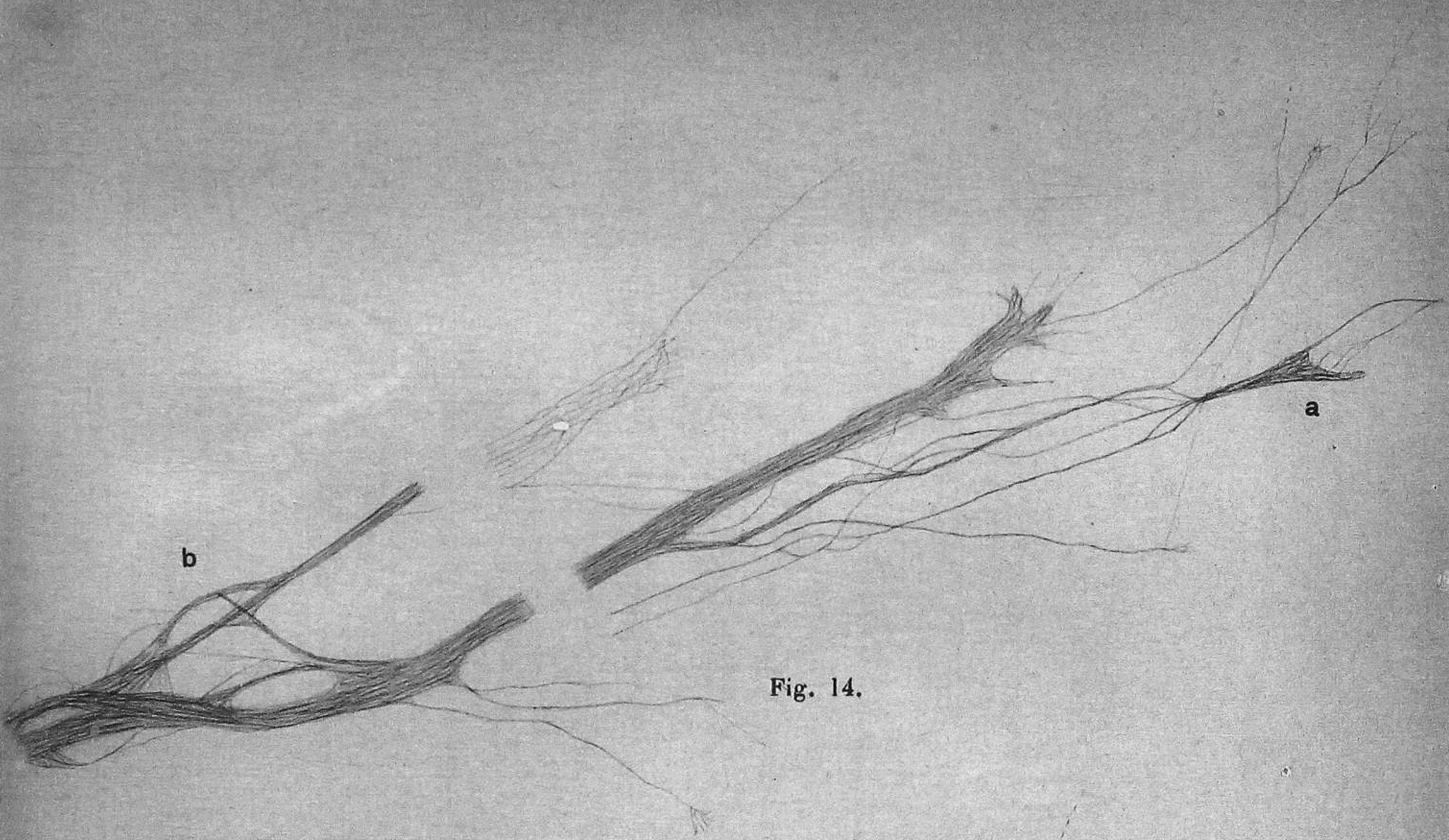


Fig. 14.

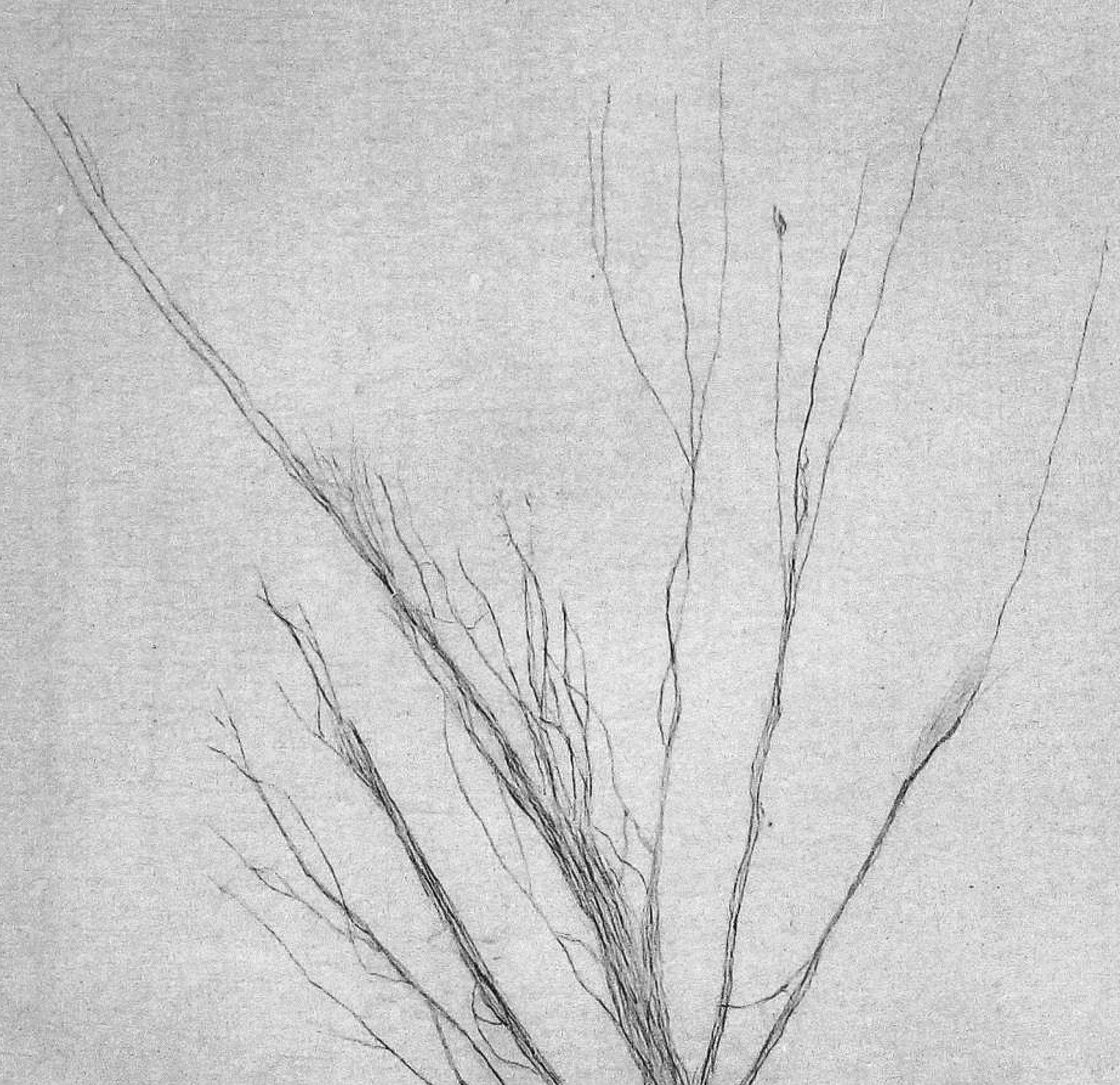


Fig. 15.

Levi, *del.*

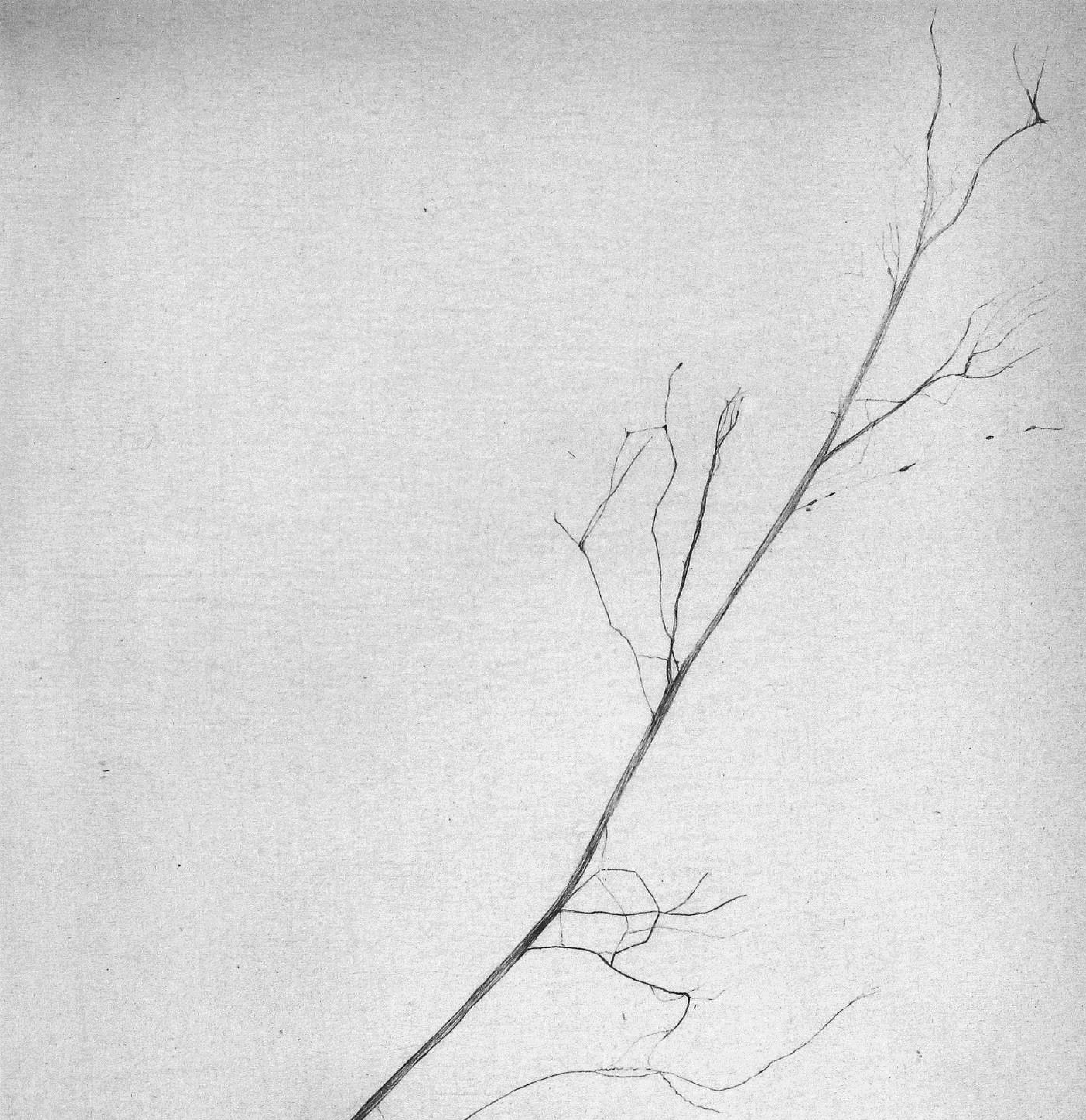


Fig. 16.

LEVI, *del.*

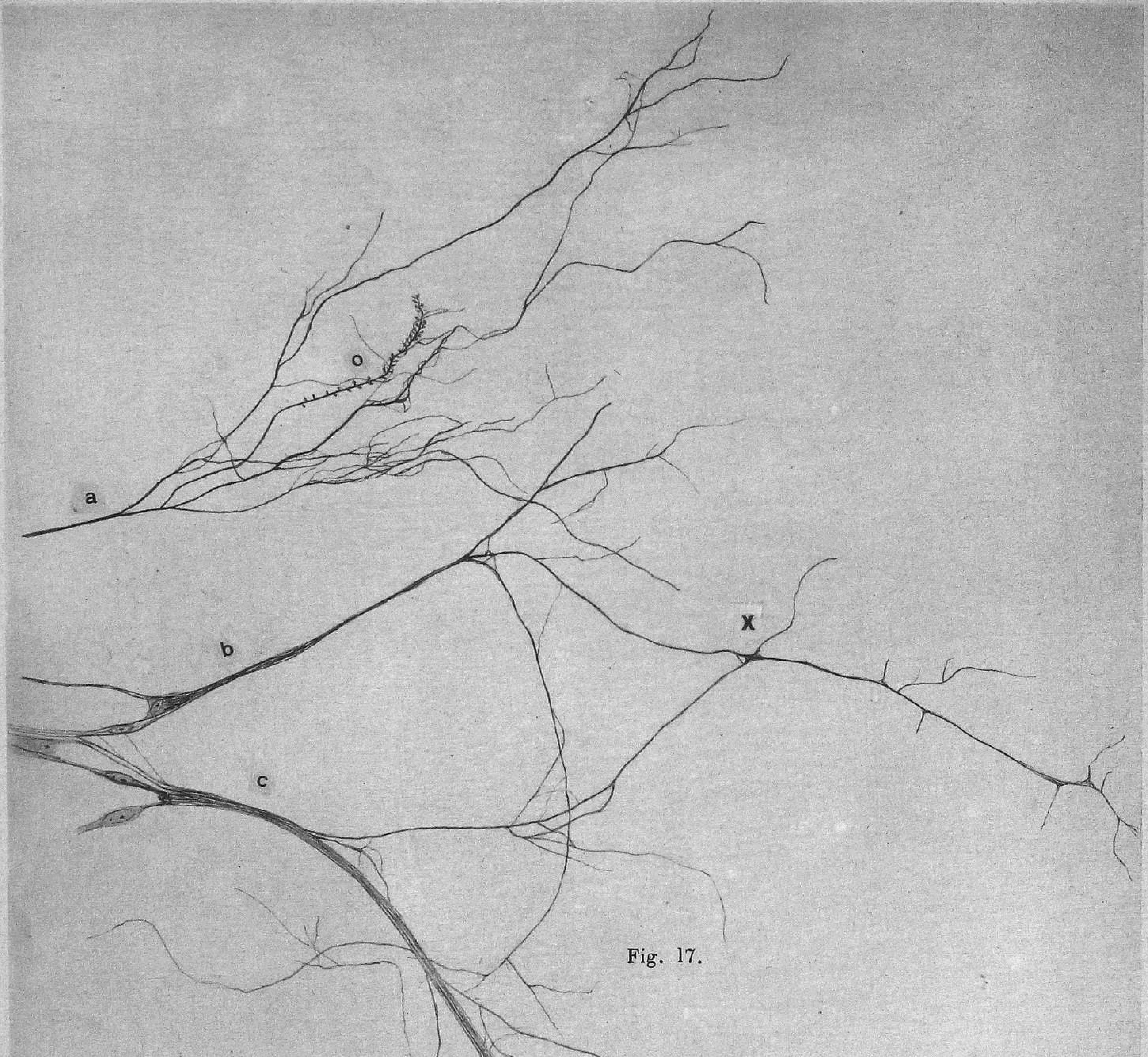


Fig. 17.

Levi, *del.*

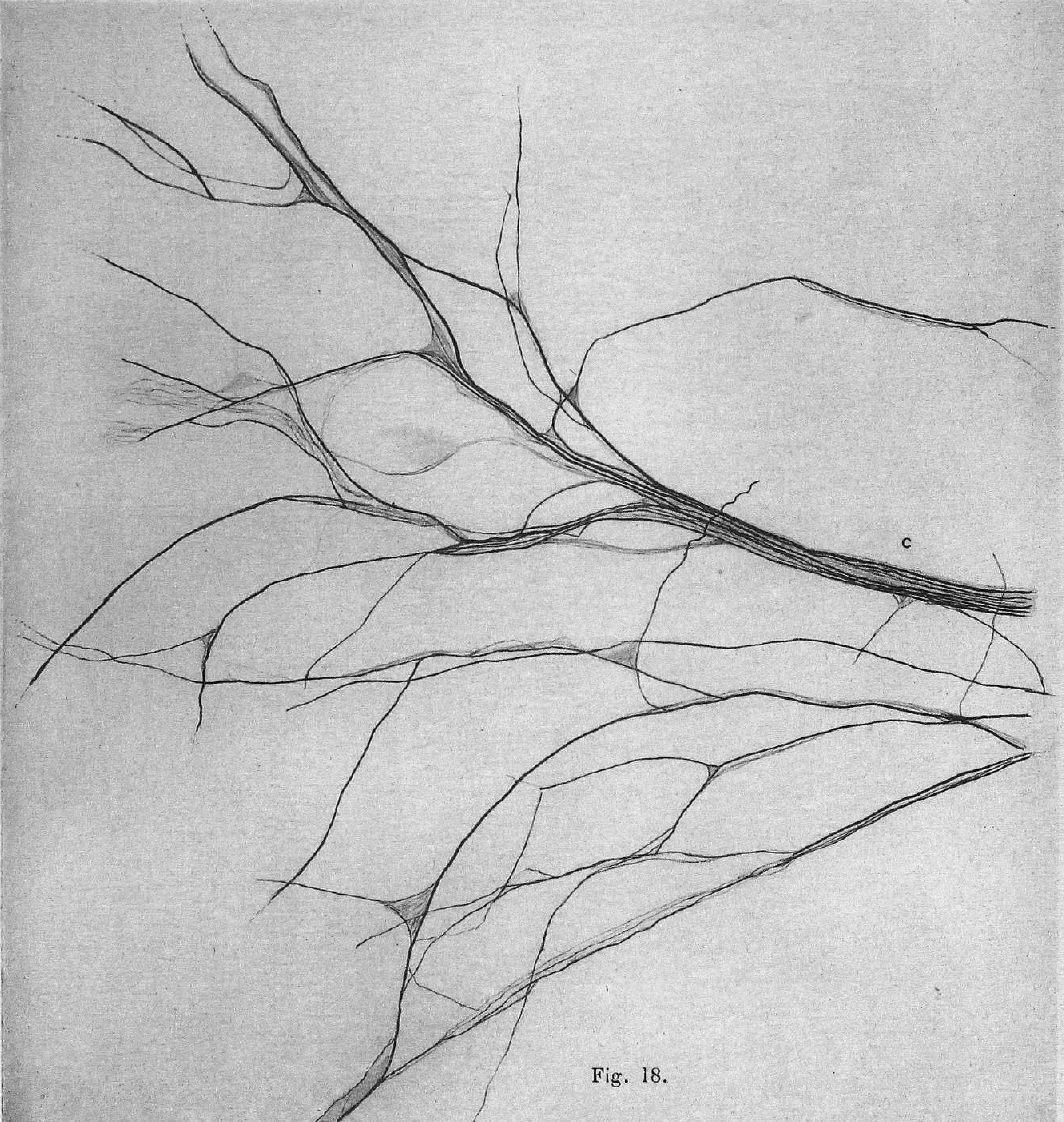


Fig. 18.

LEVI, *del.*

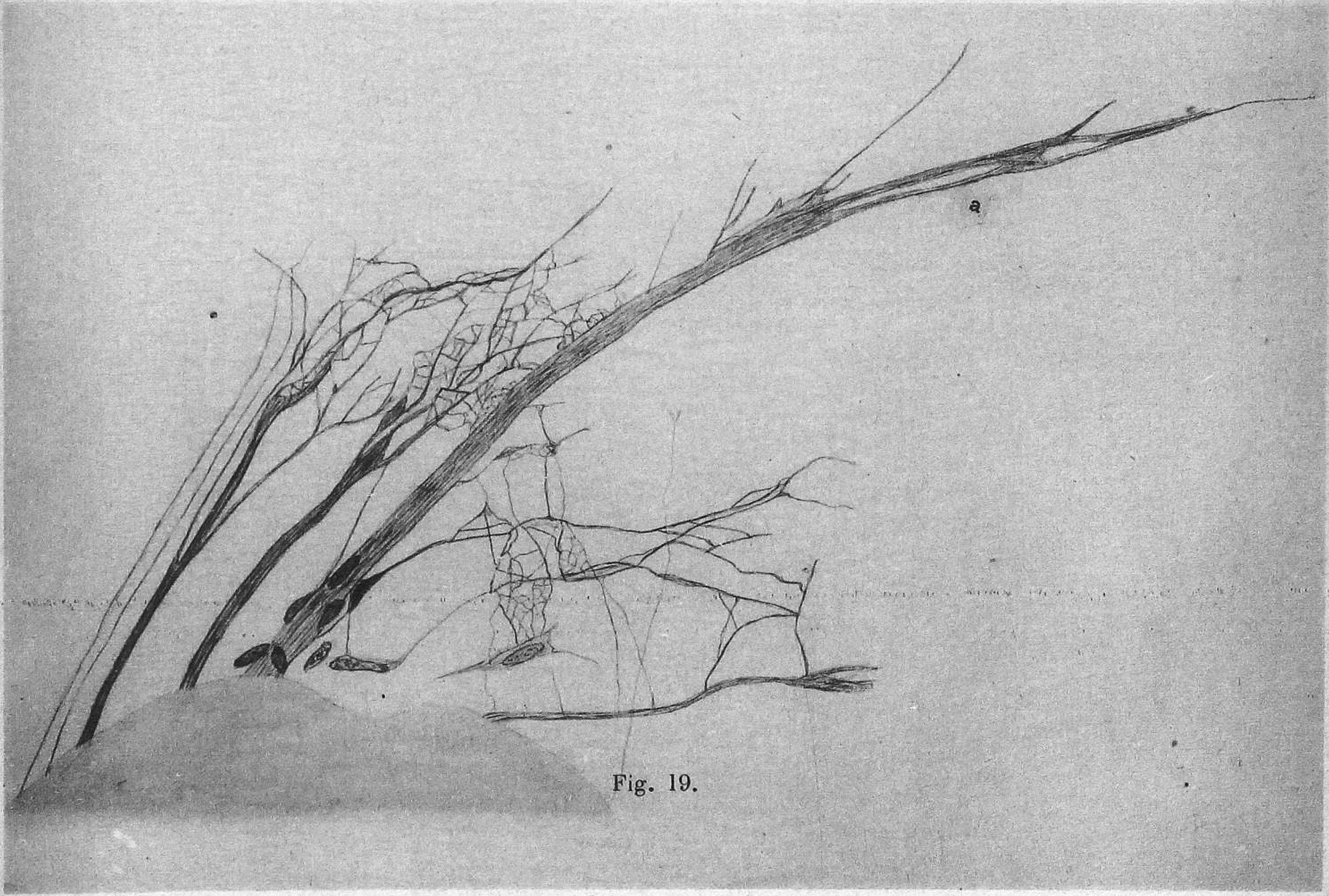


Fig. 19.

LEVI, *del.*

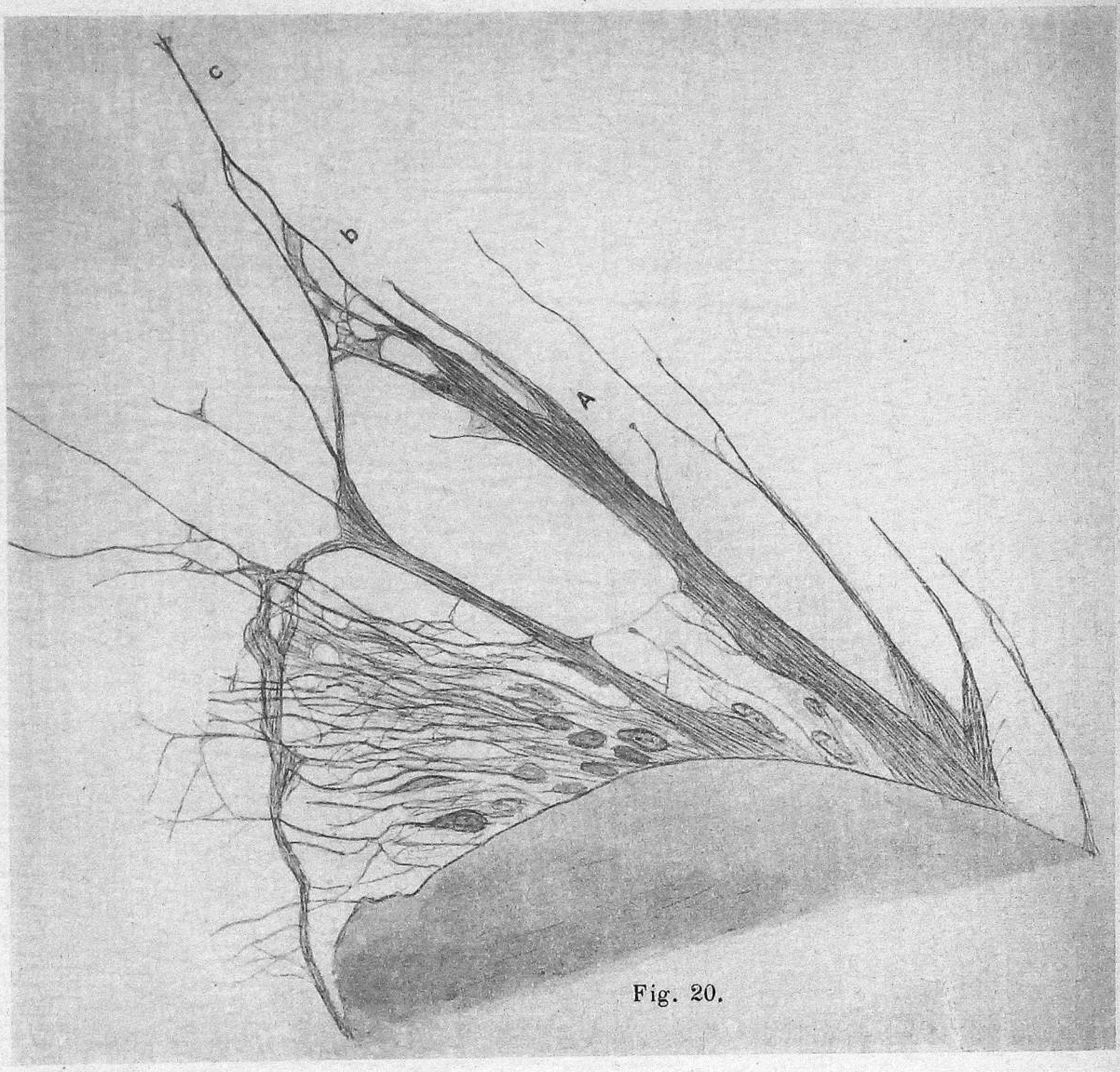


Fig. 20.

el.

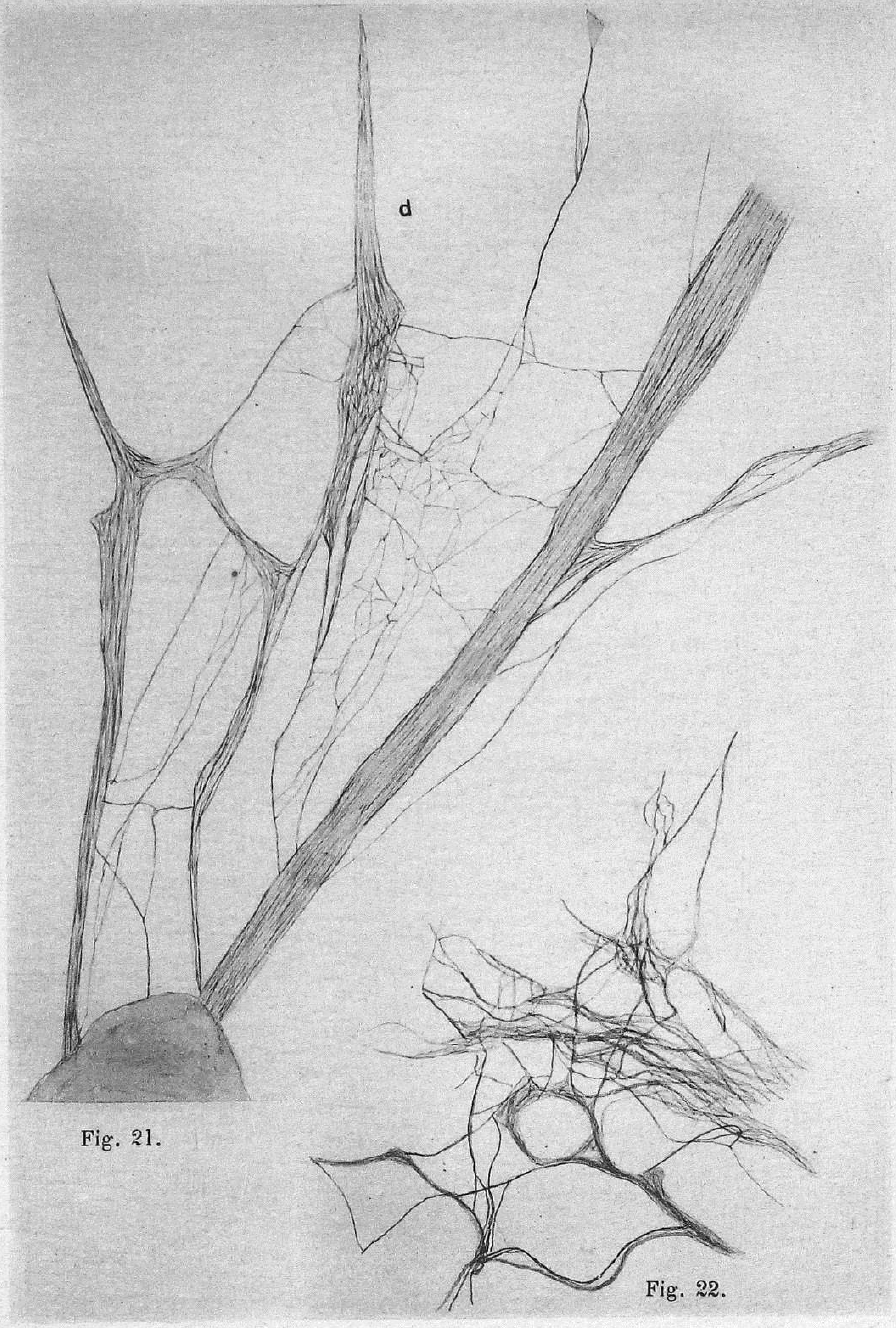


Fig. 21.

Fig. 22.

LEVI, *del.*

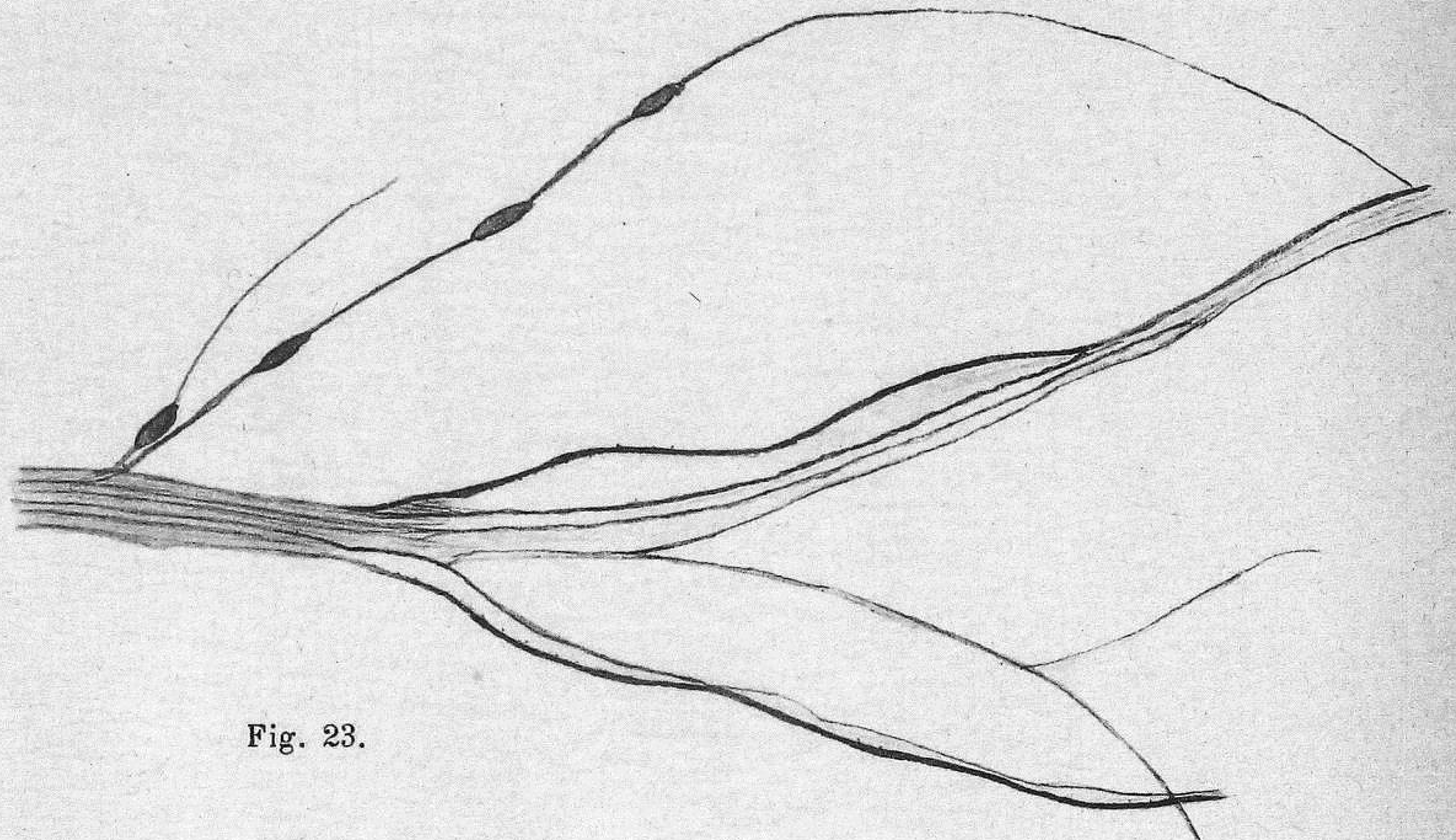


Fig. 23.

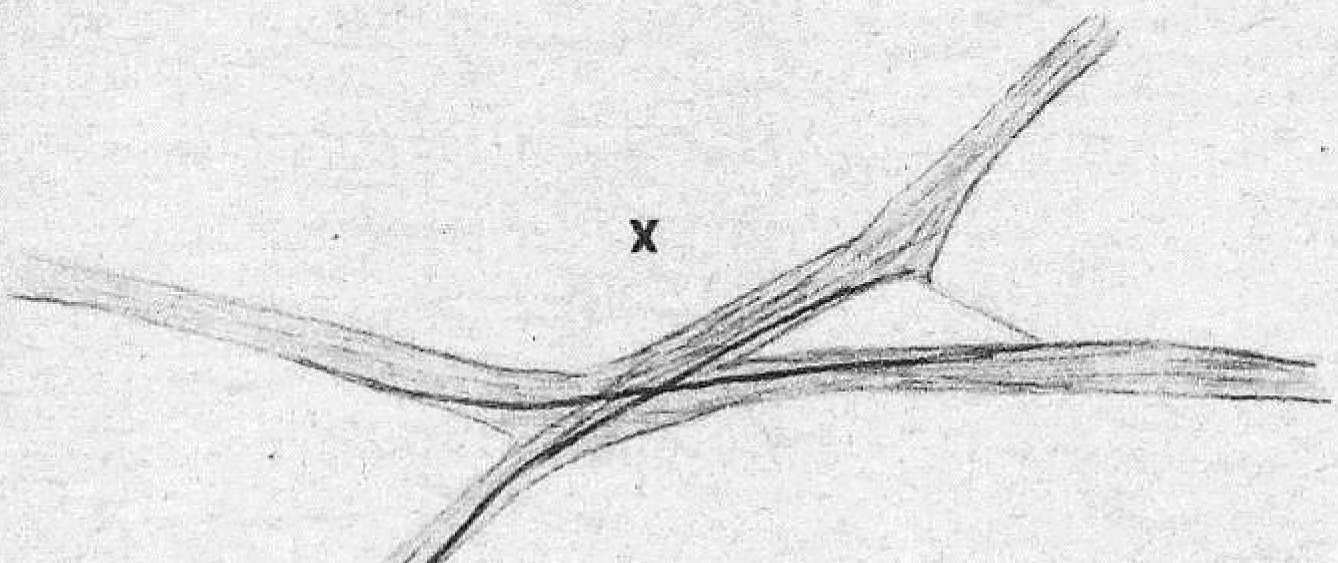


Fig. 24.

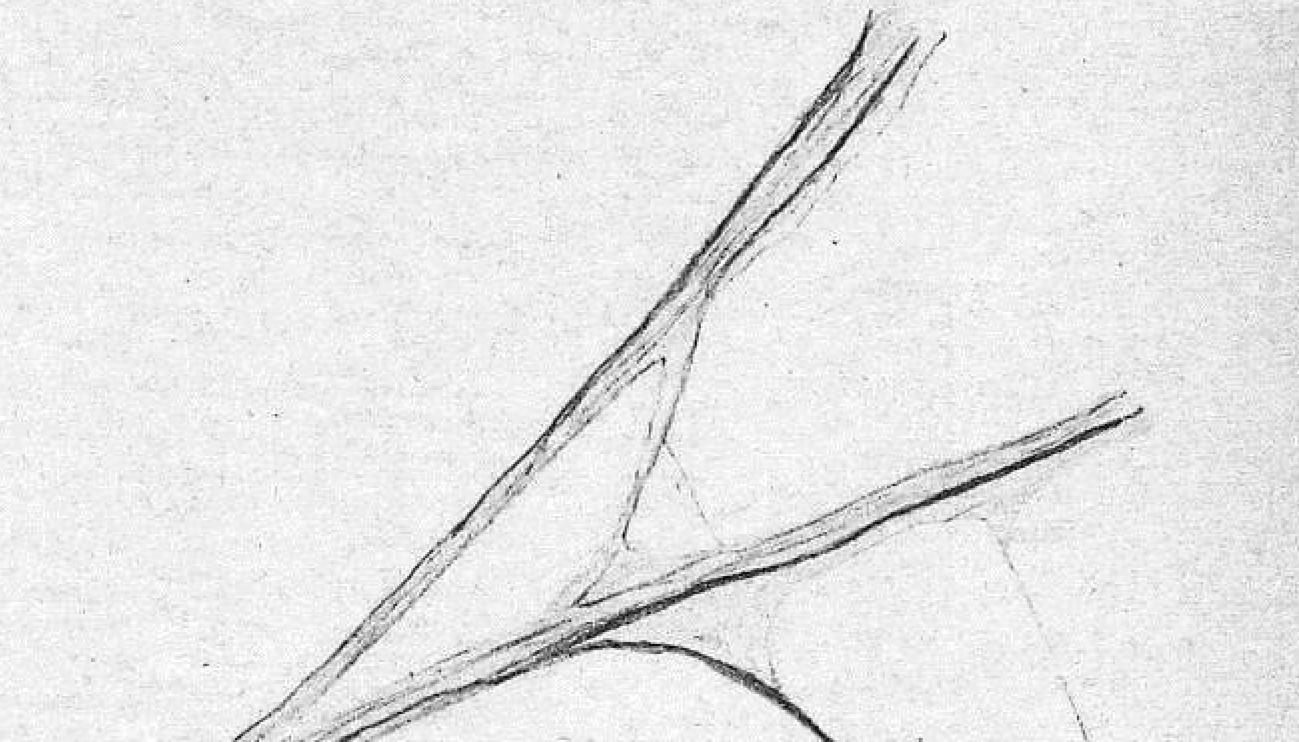


Fig. 25.

Levi, *del.*

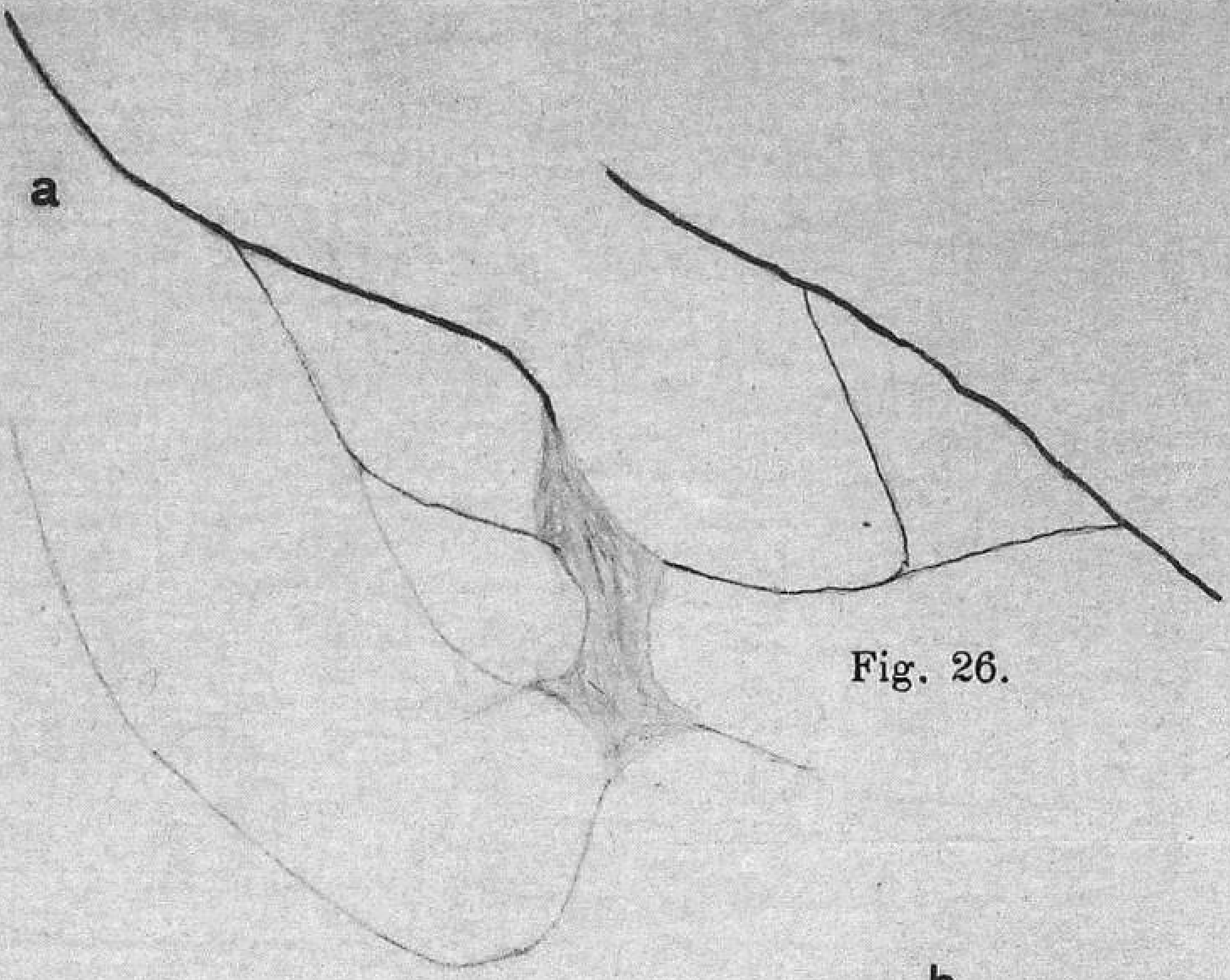


Fig. 26.

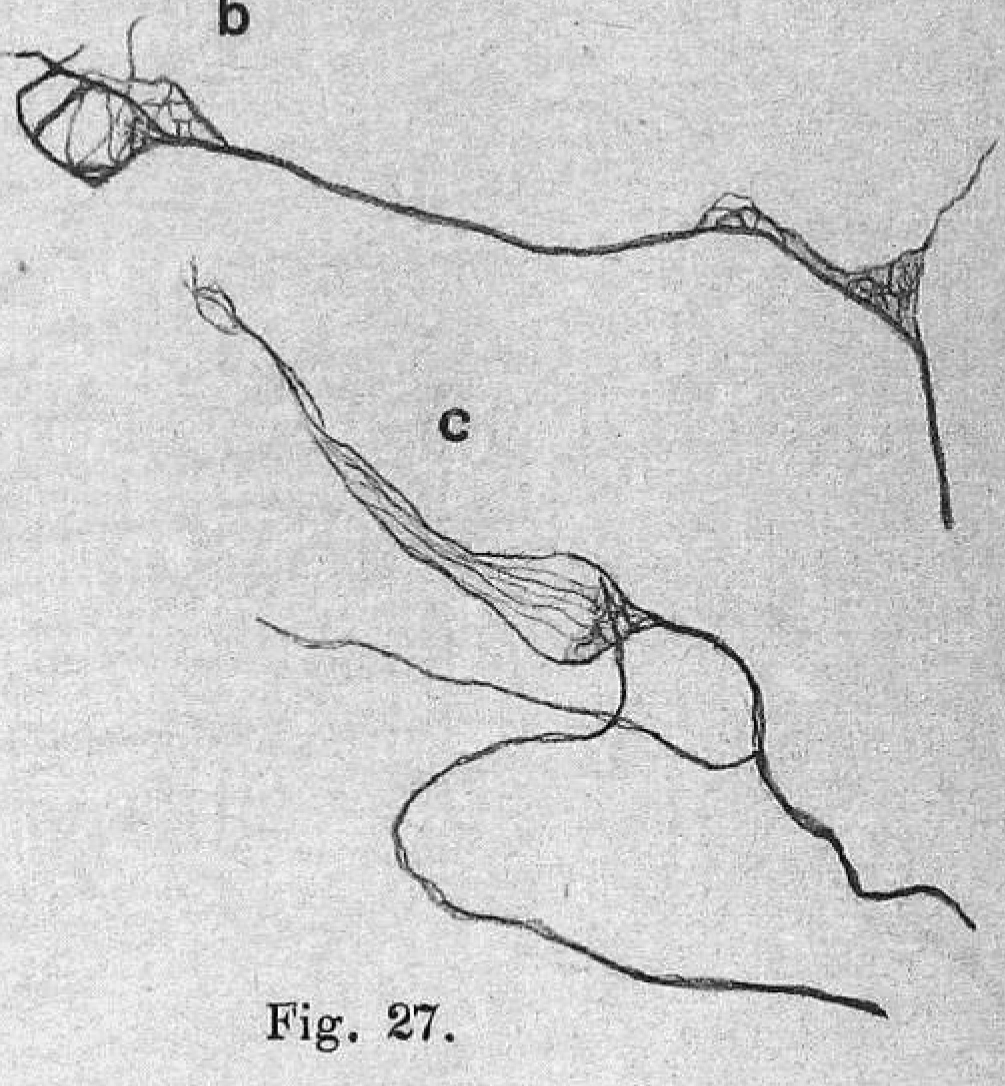


Fig. 27.

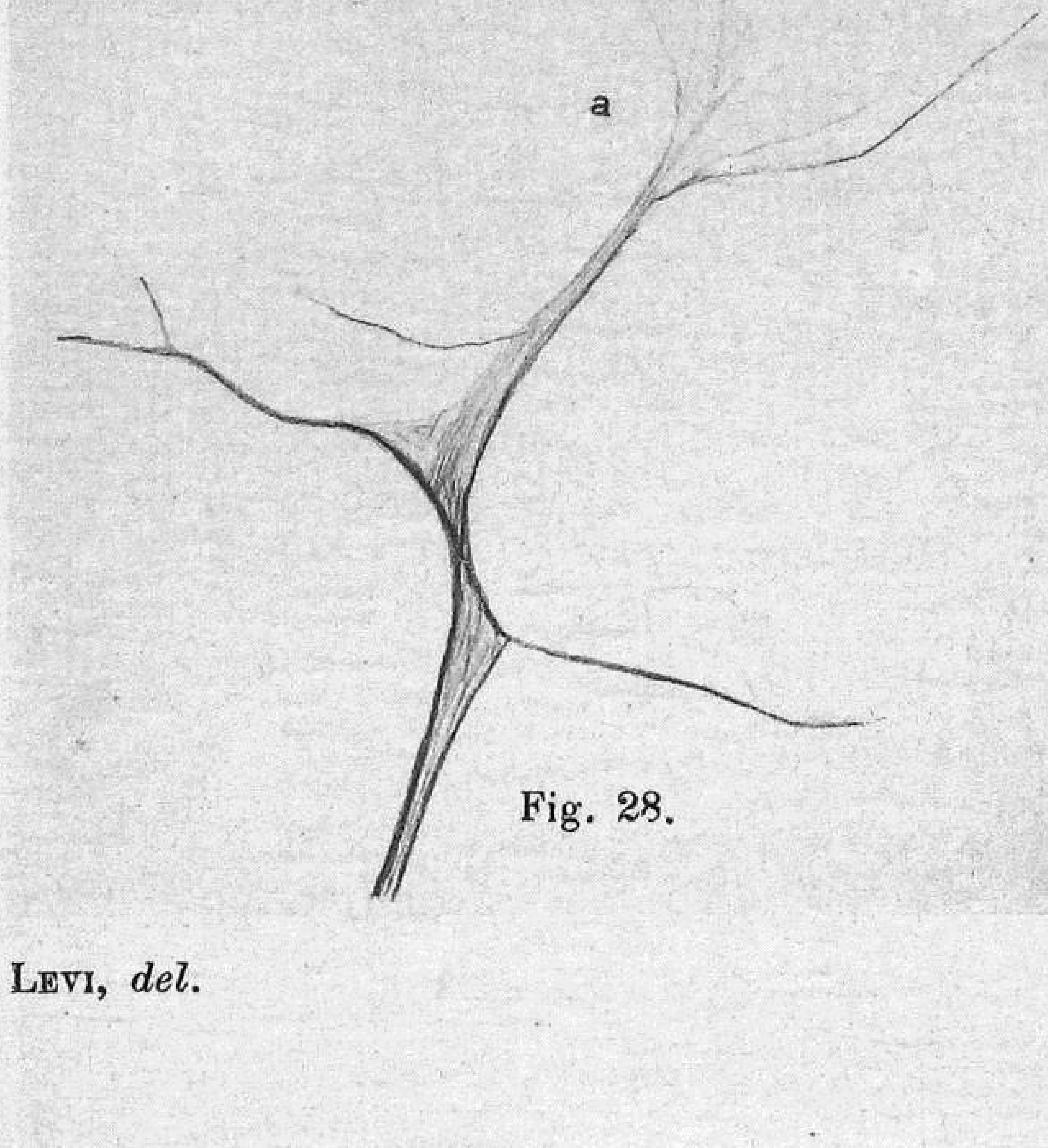


Fig. 28.

LEVI, *del.*

E DELLA CITTA' DI TORINO